

Veterinär-Anatomisches Institut
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Alois Boos

Arbeit unter der Leitung von PD Mariusz P. Kowalewski, PhD

**Die Rolle von PGE₂ als luteotroper Faktor in der frühen Gelbkörperphase der
trächtigen und nicht trächtigen Hündin und seine Bedeutung bei der Regulation des
Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Proteins**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

vorgelegt von

Barbara Fox

Tierärztin

aus Crailsheim, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

PD Mariusz P. Kowalewski, PhD, Referent

PD Dr. med. vet. Iris M. Reichler, Korreferentin

Zürich 2013

Für meine Eltern und meinen Bruder Christian

Inhalt

1	Zusammenfassung	9
2	Summary	10
3	Literaturübersicht	11
3.1	Reproduktionszyklus	11
3.1.1	Allgemeines	11
3.1.2	Anöstrus	11
3.1.3	Proöstrus	11
3.1.4	Östrus	12
3.1.5	Diöstrus	12
3.2	Entwicklung und Funktion des Corpus luteum (Cl)	12
3.3	Regulation der Corpus luteum-Funktion unter Berücksichtigung der speziellen Situation beim Hund	15
3.3.1	Progesteron	16
3.3.2	Prolaktin (PRL) und Luteinisierendes Hormon (LH)	19
3.3.3	Estradiol-17 β	20
3.3.4	Immunsystem und Zytokine	21
3.3.5	Prostaglandine	22
3.4	Die Plazenta als endokrines Organ	22
3.5	Die Rolle von Prostaglandinen im Reproduktionsgeschehen	24
3.5.1	Prostaglandinbiosynthese	24
3.5.2.1	Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	25
3.5.2.1.1	Die systemische Wirkung von PGE ₂ im Verlauf der Trächtigkeit	27
3.5.2.1.2	Die Bedeutung von PGE ₂ als auto- und parakriner Regulationsfaktor der Gelbkörperfunktion	28
3.5.2.2	Prostaglandin F ₂ α (PGF ₂ α)	29
3.5.3	Die Rolle von Prostaglandinen in der Regulation der Fortpflanzung bei der Hündin	30
3.5.3.1	Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	30
3.5.3.2	Prostaglandin F ₂ α (PGF ₂ α)	36
3.5.4	Prostaglandintransporter (PGT)	38
3.6	Die Progesteronbiosynthese und ihre Regulation	40

3.6.1	Progesteronbiosynthese	40
3.6.2	Regulation der Progesteronbiosynthese: P450scc, 3 β HSD und StAR	41
3.6.3	Funktion des Steroidogenic Acute Regulatory-Protein (StAR)	42
3.6.4	Regulation der Expression und Funktion von StAR	43
3.6.4.1	Charakterisierung des StAR-Promotors und seiner Transkriptionsfaktoren	43
4.	Material und Methoden	48
4.1	Probenmaterial	48
4.1.1	Nicht trächtige Tiere	48
4.1.2	Trächtige Tiere	48
4.1.3	Induzierter Abort	49
4.1.4	Gewinnung kaniner Luteinzellen	49
4.2	Primäre Luteinzellkultur	49
4.2.1	Isolation und Kultivierung von Luteinzellen aus dem Corpus luteum	49
4.2.2	Immunfluoreszenzfärbung der primären kaninen Lutealzellen	51
4.3	PCR und RealTime(TaqMan)PCR	52
4.3.1	RNA-Isolierung	52
4.3.1.1	RNA-Isolierung aus Gewebe	52
4.3.1.2	RNA-Isolierung aus Zellen	54
4.3.2	DNase-Behandlung	54
4.3.3	Reverse Transkription (RT)	55
4.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	56
4.3.5	Semi-quantitative RealTime(TaqMan)PCR	58
4.3.5.1	Grundlagen	58
4.3.5.2	Durchführung der RealTime(TaqMan)PCR	58
4.3.5.3	Auswertung	60
4.3.5.4	Statistische Verfahren	61
4.4	Western Blot	61
4.4.1	Proteinisolierung	61
4.4.2	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS- PAGE)	62
4.4.3	Statistische Verfahren	64
4.5	Klonierung des kaninen StAR-Promotors	64
4.5.1	Klonierung in den Plasmidvektor pGEM-T®	65

4.5.1.1	Vektoreigenschaften	66
4.5.1.2	Ligation	67
4.5.1.3	Transformation des Vektors in die Bakterien	67
4.5.1.4	Plasmidisolierung und Restriktionsverdau	68
4.6	Messung der Aktivität des kaninen StAR-Promotors im Luziferaseassay	68
4.6.1	Grundlagen des Luziferaseassays	68
4.6.2	Renilla-Kontrollkonstrukt	69
4.6.3	Klonierung in den Plasmidvektor pGL3 Basic Vector	69
4.6.3.1	Restriktionsverdau	70
4.6.3.2	Ligation	71
4.6.3.3	Transformation, Plasmidisolierung und Kontrollverdau	71
4.6.4	Transfektion der primären kaninen Luteinzellen mit dem pGL3/-250/-1 kaninen StAR-Promotorkonstrukts	71
4.6.5	Stimulation der transfizierten Zellen für den Luziferaseassay	72
4.7	Stimulation der primären Luteinzellen	73
4.7.1	Stimulationsschema	73
4.7.2	Ernte der Zellen	74
4.8	Immunhistochemie	74
5.	Ergebnisse	78
5.1	Isolation und Kultivierung von Luteinzellen aus dem Corpus luteum	78
5.2	Homologievergleich und Klonierung des kaninen StAR-Promotors	80
5.3	Transfektion primärer Luteinzellen und Messung der Promotoraktivität im Luziferaseassay	81
5.4	Stimulation primärer Luteinzellen	83
5.4.1	RealTime(TaqMan)PCR	83
5.4.2	Western Blot	84
5.4.3	Progesteronmessung im Radioimmunoassay (RIA)	84
5.5	Expression des Prostaglandintransporters im Corpus luteum cyclicum und graviditatis	86
5.5.1	RealTime(TaqMan)PCR	86
5.5.2	Immunhistochemische Darstellung des PGT im Corpus luteum	88
6	Diskussion	90
7	Literaturverzeichnis	96

8	Anhang	114
8.1	Puffer und Lösungen	114
8.2	Reagenzien	118
8.3	Verbrauchsmaterialien und Geräte	121
9	Danksagung	124
10	Lebenslauf	125

1 Zusammenfassung

Prostaglandine (PG) wurden mehrfach als auto-/parakrin wirkende Mediatoren in der Regulation der Fortpflanzung beschrieben. Das Corpus luteum (Cl) des Hundes ist im ersten Drittel der Trächtigkeit teilweise unabhängig von gonadotroper Unterstützung. Analog zu anderen Spezies wurde postuliert, dass in diesem Zeitraum im Gelbkörper produzierte PG auto-/parakrin wirken. Frühere Untersuchungen zeigten, dass sowohl die Cyclooxygenase 2 (COX2) als auch die PGE₂-Synthase (PGES) verstärkt während der frühen Gelbkörperphase im Cl exprimiert werden. Um die Hypothese einer auto-/parakrinen Wirkung von PGE₂ zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit kanine Lutealzellen in der frühen Lutealphase isoliert und mit PGE₂ stimuliert. Eine erhöhte StAR-Promotoraktivität, eine verstärkte Expression von StAR-Protein und eine gesteigerte Progesteronsynthese konnten als Reaktion gezeigt werden. Die Expression von Cytochrom P450_{scc}-Enzym und 3 β Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Δ -5/ Δ -4Isomerase (3 β HSD) war hingegen nicht verstärkt. Zusätzlich wurde die Expression des Prostaglandintransporters (PGT) im Cl der trächtigen und zyklischen Hündin untersucht, wobei eine zeitabhängige Expression des PGT mit stärksten Signalen im Cl in der frühen Lutealphase gezeigt wurde. PGE₂ wurde somit als luteotroper Faktor in der frühen Phase des Cl bestätigt, wobei das Expressionsmuster des PGT die Hypothese der auto-/parakrinen Rolle von Prostaglandinen in dieser Phase unterstützt.

Schlüsselwörter:

PGE₂, Corpus luteum, Hündin, StAR, PGT

2 Summary

Prostaglandins were described as potent mediators in the auto/paracrine regulation of reproduction. The canine Corpus luteum (Cl) is in part independent of gonadotrop support in the first third of diestrus. Analog to other species, it was postulated, that locally produced prostaglandins act via auto/paracrine mechanisms during this phase. Earlier experiments showed, that both cyclooxygenase 2 (COX2) and prostaglandin E₂ (PGE₂) -synthase (PGES) are strongly expressed in the early Cl-phase. To support the hypothesis of an auto/paracrine effect of PGE₂, canine luteal cells were isolated in the early luteal phase and stimulated with PGE₂. An upregulated StAR-promotor activity, an increased StAR-protein expression and an enhanced synthesis of P4 could be shown. In contrast, the expression of cytochrome P450_{scc} and 3 β hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ -5/ Δ -4 isomerase (3 β HSD) remained unaffected. Additionally, the expression of the prostaglandin transporter (PGT) in Cl of pregnant and non-pregnant dogs was assessed and revealed a time-dependent expression with strongest signals in the early luteal phase. Consequently, PGE₂ proved to be a steroidogenic factor in luteal cells isolated during the early Cl-phase, while the expression pattern of PGT supports the hypothesis of prostaglandins acting via auto/paracrine mechanisms in this period.

Keywords: PGE₂, corpus luteum, bitch, StAR, PGT

3 Literaturübersicht

3.1 Reproduktionszyklus

3.1.1 Allgemeines

Der domestizierte Hund (*Canis lupus familiaris*) ist ein asaisonal monoöstrisches Tier. Der Reproduktionszyklus lässt sich beim Hund in die Phasen Anöstrus, Proöstrus, Östrus und Diöstrus einteilen. Beim Hund ist herauszustellen, dass eine hohe individuelle Variabilität sowohl hinsichtlich der Gesamtzykluslänge als auch der einzelnen Phasen herrscht. Besonders der Anöstrus als längste Zyklusphase weist von Tier zu Tier starke Unterschiede auf und ist somit massgebend für die Gesamtdauer des Zyklus und die Häufigkeit einer eintretenden Läufigkeit. Mit einem durchschnittlichen Wert von 125 Tagen (Christiansen, 1984) ist bei der Hündin der Zyklus länger als die Gravidität, welche im Durchschnitt 65 Tage dauert (Concannon, 2009).

3.1.2 Anöstrus

Wie bereits erwähnt ist der Anöstrus die Zyklusphase mit der höchsten Variabilität. Unterschiedliche Quellen sprechen von einer Varianz zwischen 15-265 Tagen (Feldman, 1987; Schnorr, 2006) beziehungsweise 2-10 Monaten (Concannon, 2009).

Der Anöstrus als Phase der sexuellen Inaktivität ist gekennzeichnet durch niedrige Hormonwerte und klinisch unauffällige Geschlechtsorgane. Estradiol und Progesteron sinken auf ihre Basalwerte, FSH und LH werden nur in geringen Mengen ausgeschüttet. Dies ändert sich jedoch im späten Anöstrus, wo eine steigende LH-Pulsfrequenz zu beobachten ist, welche später zur präovulatorischen Luteinisierung des Follikels führt, was ebenfalls eine Besonderheit beim Hund darstellt (Concannon et al., 1977; Concannon et al., 1975).

3.1.3 Proöstrus

Der Proöstrus mit einer Dauer von 3-17, im Durchschnitt 9 Tagen (Noakes, 2009) zeichnet sich durch klinische Veränderungen aus, die durch eine in dieser Phase herrschende Östrogendominanz hervorgerufen werden. Unter dem Einfluss von FSH aus dem Hypophysenvorderlappen reift eine Kohorte von Follikeln im Ovar heran. Aufgrund der Syntheseleistung der heranwachsenden Follikel steigt Estradiol während des Proöstrus von Basalwerten um 5-10 pg/ml auf Maximalwerte von 45-120 pg/ml, welche im Allgemeinen zirka 1-3 Tage vor dem präovulatorischen LH-Peak auftreten (Concannon, 2009). Vulva und Vaginalschleimhaut schwellen aufgrund der östrogenbedingten Ödematisierung und Hyperämie

an und die Hündin zeigt blutig-serösen Vaginalausfluss im Sinne einer Diapedeseblutung. Die Hündin wird aufgrund von Pheromonausschüttung attraktiv für Rüden, duldet den Deckakt aber noch nicht (Concannon et al., 1975).

3.1.4 Östrus

Das Einsetzen des Östrus wird durch das Duldungsverhalten der Hündin markiert. Neben der Duldung des Aufspringens durch den Rüden zeigt die Hündin ihre Paarungsbereitschaft durch das Seitwärtsbiegen des Schwanzes und Präsentation der Vulva (Concannon et al., 1975). Das beginnende Akzeptanzverhalten tritt zeitgleich mit einem Anstieg des zirkulierenden LH auf, welcher in Maximalwerten von 4-40 ng/ml gipfelt (Nett et al., 1975). Dieser präovulatorische LH-Peak führt zu einer Schlussselektion von dominanten Follikeln und schliesslich 48-60 Stunden später zum Sprung mehrerer noch unreifer Oozyten (Concannon, 2009). Die Ovulationen können nach Abklingen der proöstrischen Blutung über mehrere Tage erfolgen, treten jedoch meist innerhalb der ersten 1-2 Tage nach dem LH-Peak auf (Phemister et al., 1973) und können, vor allem bei jungen Hündinnen, bereits innerhalb von 50 h nach LH-Spitzenwerten beendet sein (Concannon et al., 1977). Die Dauer des Östrus variiert zwischen 5-14 Tagen und ist somit im Vergleich zu anderen Spezies ebenfalls relativ lang (Concannon et al., 1977; Feldman, 1987).

3.1.5 Diöstrus

Der Diöstrus markiert die Zeitspanne, während der ein oder mehrere zyklische Gelbkörper existieren, weswegen diese Phase auch als Gelbkörperphase bezeichnet wird. Dominierendes Hormon ist das Progesteron.

Die Veränderungen im Verhalten und an den Geschlechtsorganen der Hündin gehen zurück und verschwinden schliesslich.

Die Dauer des Diöstrus beträgt 60-90 Tage. Nach kontinuierlich sinkenden Progesteronwerten ist ab einem Basalwert von < 1ng/ml (Concannon, 1993) die Phase des Anöstrus wieder erreicht.

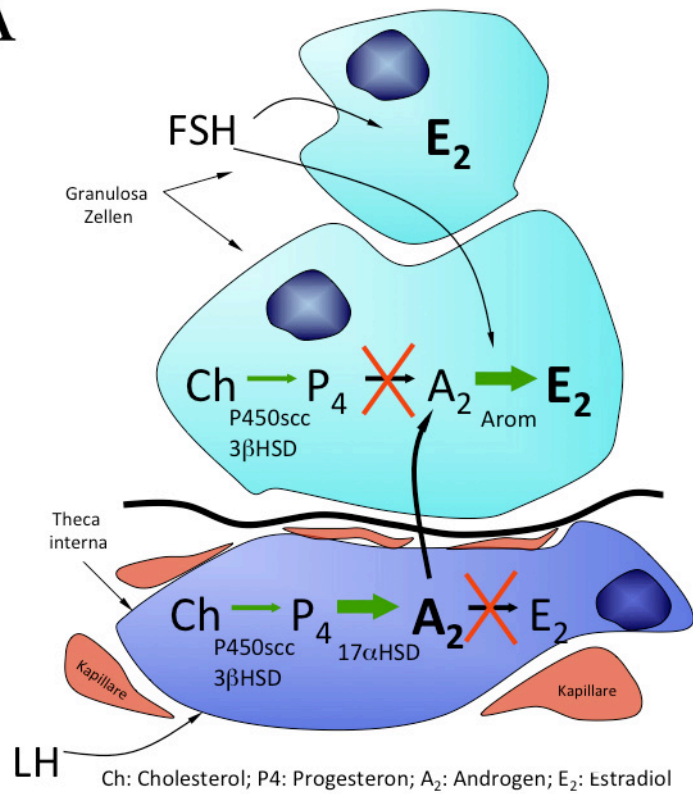
3.2 Entwicklung und Funktion des Corpus luteum (Cl)

Das Corpus luteum ist eine endokrine Drüse mit zeitlich begrenzter Lebensdauer, welche sich aus zurückbleibenden Zellen der Theca interna und Granulosazellen des gesprungenen Follikels entwickelt (Feldman, 1987). Ihre Aufgabe ist die Bereitstellung von Progesteron, welches zum Erhalt der Trächtigkeit benötigt wird (Concannon et al., 1989).

Der Luteinisierung liegen funktionelle Veränderungen auf zellulärer Ebene zugrunde. Mit der Ovulation findet eine Verschiebung in der Enzymausstattung der Theca interna- und Granulosazellen des gesprungenen Follikels statt. Eine Übersicht über die im Folgenden geschilderten Vorgänge findet sich bei Niswender et al. (2000) (Niswender et al., 2000). Im wachsenden Follikel ist Estradiol das primäre Steroidhormon, welches im Ovar gebildet wird. Während Thecazellen die Enzymausstattung zur Umwandlung von Cholesterol in die Androgene besitzen, fehlt ihnen die Aromatase zur Umwandlung der Androgene in Estradiol. Im Gegenzug besitzen die Granulosazellen zwar selbst nicht die Fähigkeit, synthetisiertes Progesteron in Androgen umzuwandeln, sie können jedoch aufgrund der Ausstattung mit der Aromatase Cytochrom P450_{scc} von den Thecazellen synthetisierte Androgene ihrerseits in Estradiol umwandeln.

Im Zuge der funktionellen Luteinisierung verschiebt sich die Steroidogenese im Ovar zugunsten der Produktion von Progesteron, welches in den Luteinzellen synthetisiert wird. Eine Unterscheidung in Theca- und Granulosazellen kann somit nicht mehr getroffen werden (Bao and Garverick, 1998) (Abb. 3.2). Um die Freisetzung der benötigten grossen Mengen an Progesteron zu gewährleisten, findet eine verstärkte Expression der Enzyme statt, welche zur Synthese des Hormons führen. Die Progesteronsynthese wird im Kapitel 3.6 dargestellt. Im Gegenzug findet eine verminderte Expression der 17 α -Hydroxylase und der Aromatase statt, welche beide an der Synthese von Estradiol beteiligt sind. Trotz der verminderten Enzymexpression bleibt die Fähigkeit der Luteinzellen, Estradiol in einer gewissen Menge zu produzieren, erhalten. Dieser Sachverhalt wurde bei Schwein, Mensch und Ratte beschrieben (Übersicht bei (Niswender et al., 2000). Auf die Rolle von im Gelbkörper des Hundes synthetisiertem Estradiol wird im Kapitel 3.3.3 im Detail eingegangen.

A



B

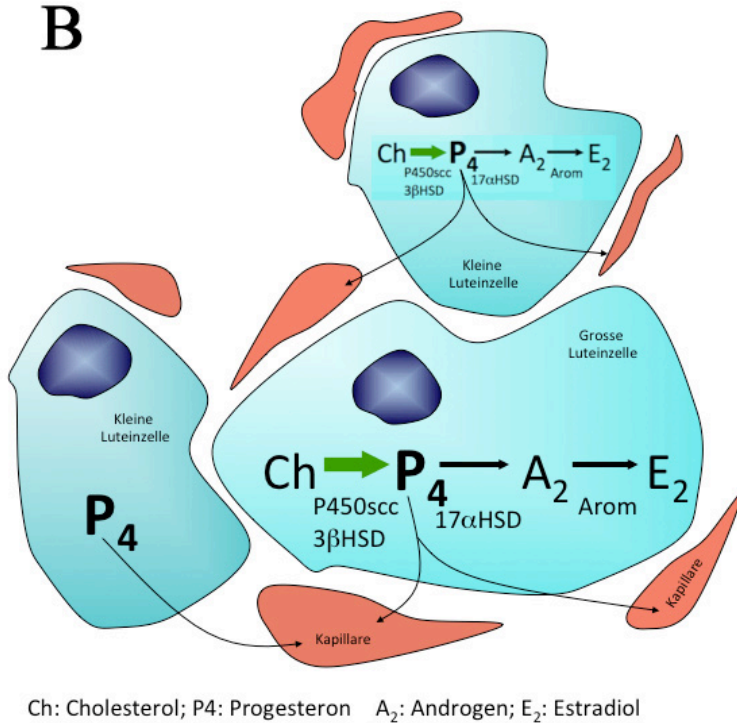


Abb. 3.2: Funktionelle Veränderungen während der Luteinisierung. A: Vor der Ovulation, B: Nach der Ovulation. (Kowalewski, MP, modifiziert nach Bhoi, DB, Anand Agricultural University, India, „Mechanisms controlling Corpus Luteum Function“)

Auf struktureller Ebene sind folgende Vorgänge zu beobachten:

Nach der Ovulation befinden sich in der ehemaligen Follikelhöhle in geringem Masse Blutserum und restliche Follikelflüssigkeit. In die Follikelhöhle einspriessende feine Bindegewebszüge bilden ein Gerüst, von welchem die Organisation des Gelbkörpers ausgeht. Lichtmikroskopisch kann eine Unterscheidung zwischen grossen Luteinzellen, welche sich von den Zellen der Theca interna ableiten und kleinen Luteinzellen, welche aus den Granulosazellen entstehen, getroffen werden. Diese Unterscheidung ist beim Hund jedoch nicht möglich (Andersen, 1973).

Der Prozess der Luteinisierung wird von einer umfangreichen Angiogenese begleitet. Von der Theca interna aus erfolgt die Vaskularisation des entstehenden Corpus luteum entlang der Bindegewebestrabekel. Die massive Proliferation der Endothelzellen findet hauptsächlich in der Phase der Anbildung des Gelbkörpers statt, anschliessend sinkt die Proliferationsrate erheblich. Die Ausbildung eines dichten Gefässnetzes im Corpus luteum ist essentiell, um die Versorgung des Gelbkörpergewebes im Verlauf der Trächtigkeit zu gewährleisten (Wulff et al., 2000). Weiterhin ermöglicht das gebildete Kapillarnetz die Einwanderung verschiedener Zelltypen des Immunsystems, deren Präsenz für eine adäquate Funktion des Cl von Bedeutung ist (Reynolds et al., 1992).

Je nachdem, ob es sich um eine uni- oder multipare Spezies handelt, kommen ein bis mehrere Follikel zum Sprung. Abhängig von der Anzahl ovulierter Follikel bilden sich somit Gelbkörper aus. Bei der Hündin als multiparem Tier entwickeln sich abhängig von der Rasse pro Ovar 2-15 Corpora lutea, wobei die Grösse zwischen 4 und 12 mm im Durchmesser variieren kann. Die Gelbkörper beherrschen die Oberfläche des Ovars, wodurch es ein traubenähnliches Erscheinungsbild erhält. Makroskopisch erscheint das Gewebe rötlich-gelb, was durch eine Einlagerung von gelblichen Pigmenten, sogenannten Lipochromen, entsteht (Feldman, 1987).

3.3 Regulation der Corpus luteum-Funktion unter Berücksichtigung der speziellen Situation beim Hund

Als luteotrop werden Faktoren bezeichnet, welche das Corpus luteum in seiner Bildung und Funktion unterstützen. Hierbei kommen sowohl endokrine als auch auto- und parakrine Mechanismen zum Tragen. Diese Mechanismen der Gelbkörperregulation wurden sowohl für die nicht trächtige als auch die trächtige Hündin von vielen Autoren beschrieben (Übersicht bei Hoffmann et al., 2004). Bei der Hündin ist besonders herauszustellen, dass das Corpus luteum im ersten Drittel der Trächtigkeit oder des Diöstrus zum Teil unabhängig von gonadotroper

Unterstützung ist (Okkens et al., 1986). Okkens et al. beschreiben das Cl in den ersten 2-4 Wochen nach der Ovulation als gonadotropin-unabhängig. In dieser frühen lutealen Phase wird die Existenz des Corpus luteum nicht von einer Hypophysektomie beeinflusst (Concannon et al., 1987; Okkens et al., 1986). Somit können eine frühe gonadotropinunabhängige und eine anschließende gonadotropinabhängige Phase während der Existenz des Gelbkörpers unterschieden werden. Welche Faktoren in der jeweiligen Phase eine Rolle spielen, soll in folgender Übersicht erläutert werden.

3.3.1 Progesteron

Das Steroidhormon Progesteron wird traditionellerweise als das “Trächtigkeitshormon” bei Säugetieren angesehen, wie sein Name bereits indiziert (Baulieu, 1989). Zahlreiche Studien belegen die essentielle Rolle dieses Hormons in verschiedenen Phasen der Trächtigkeit, wie im Folgenden ersichtlich wird. Versuche an Knockoutmäusen haben gezeigt, dass bereits präovulatorisch gebildetes Progesteron essentiell für Follikelruptur und Oozytenreifung ist (Lydon et al., 1995). Bei der Etablierung und Erhaltung der Trächtigkeit übt Progesteron wichtige Funktionen aus. Es inhibiert am Endometrium die östrogenvermittelte Epithelproliferation, welche eine geordnete Implantation der Blastozyste verhindern würde (Lydon et al., 1995). Weiterhin induziert Progesteron die Differenzierung von Stromazellen und es stimuliert die Sekretion der Uterindrüsen (Maslar et al., 1986). Progesteron verändert das Muster der von den endometrialen Zellen sezernierten Proteine, wodurch ein günstiges Milieu für die Frucht entsteht (Strinden and Shapiro, 1983). Am Myometrium wirkt Progesteron über eine elektrische Entkoppelung der glatten Muskulatur ruhigstellend (Parkington, 1983). Auch hat Progesteron antiinflammatorische Eigenschaften, da es der Rekrutierung von Leukozyten und Makrophagen im Uterus entgegenwirkt (Tibbetts et al., 1999). In der Milchdrüse induziert Progesteron die Proliferation des Gewebes und führt im Sinne einer Oberflächenvergrößerung zur Ausbildung von zusätzlichen Verzweigungen der Drüsengänge (Mulac-Jericevic et al., 2000). Auf systemischer Ebene reduziert Progesteron durch negative Feedbackmechanismen die Sekretion von LH und unterbricht somit die Anbildung neuer Follikel, bis eine Rezeptivität des Organismus wieder gewährleistet ist (Robinson et al., 2000)

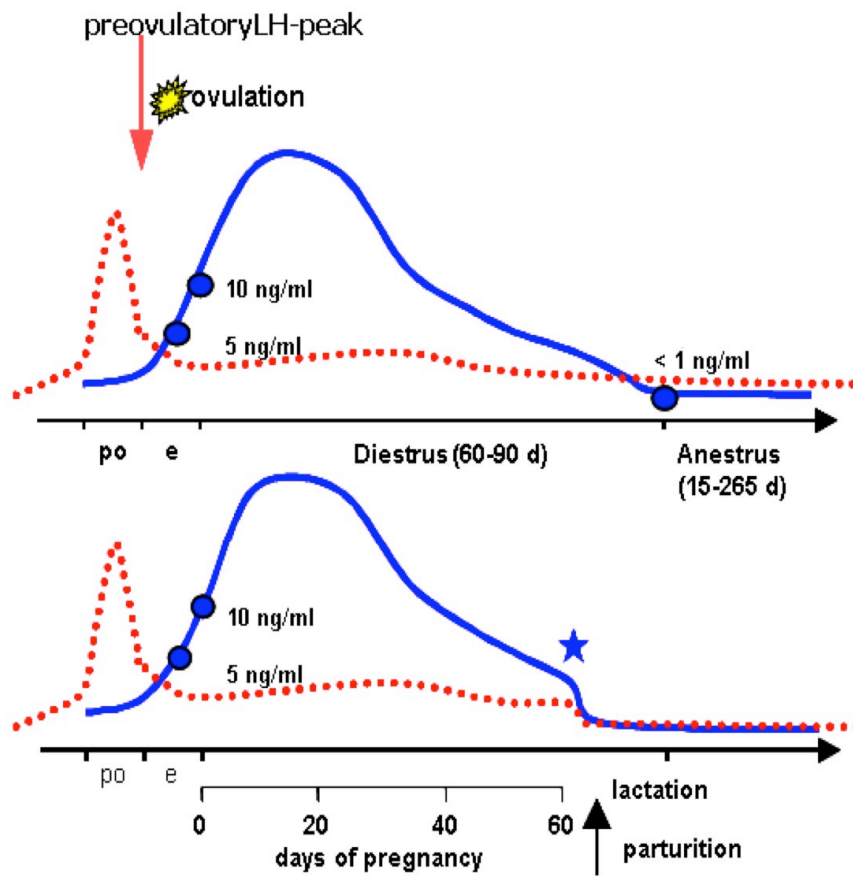
Beim Hund wird das ovarielle Progesteron absolut für den Erhalt der Trächtigkeit benötigt. Eine Ovariectomie führt bei dieser Spezies in jedem Stadium der Trächtigkeit zum Abort (Concannon, 1980). Dies zeigt, dass das Corpus luteum beim Hund die entscheidende Quelle

des zum Erhalt der Trächtigkeit notwendigen Progesterons ist (Concannon et al., 1989; Nishiyama et al., 1999).

Im Corpus luteum des Hundes findet bereits präovulatorisch eine Luteinisierung der Granulosazellen statt. Diese vorzeitige Luteinisierung ist notwendig für den ovulationsauslösenden LH-Peak (Verstegen-Onclin and Verstegen, 2008) und spiegelt sich in der Serumprogesteronkonzentration wider. Die Ovulation findet bei einer Progesteronkonzentration von zirka 5ng/ml statt (Concannon, 1993). Der präovulatorische Progesteronanstieg setzt sich nach dem Sprung der Follikel fort, um schliesslich zwischen Tag 20 und 30 post ovulationem (p.o.) ein Maximum mit Werten von 15-90 ng/ml zu erreichen (Concannon et al., 1989). Anschliessend nimmt die Kurve einen allmählich abfallenden Verlauf. Während die Konzentrationskurve des Progesterons bei gravider und zyklischer Hündin bisher nahezu identisch war (Jones et al., 1973), ist gegen Tag 63 eine Abweichung zwischen trächtiger und nicht trächtiger Hündin festzustellen. Beim zyklischen Tier sinkt die Progesteronkonzentration kontinuierlich bis zum Erreichen des Basalwertes ab, beim trächtigen Tier jedoch findet 12 - 48 Stunden präpartal ein rapider Abfall des Serumprogesterons von zirka 10 ng/ml auf unter 1 ng/ml statt (Concannon and Hansel, 1977; Concannon et al., 1988) (Abb. 3.3.1). Die möglichen zugrundeliegenden Mechanismen für den Progesteronabfall werden bei der Besprechung der Luteolyse unter 3.5.3.2 diskutiert.

Eine Konsequenz des nahezu identischen Progesteronprofils bei trächtigen und nicht trächtigen Tieren ist die klinische Unbrauchbarkeit von Progesteron als Trächtigkeitsmarker beim Hund. Neben den geschilderten Effekten von Progesteron auf Mamma und Uterus wird beim Hund eine auto-/parakrine Wirkung von Progesteron im Corpus luteum angenommen. Bereits bei anderen Spezies wie Rind (Bah et al., 2006), Pferd (Ferreira-Dias et al., 2006) und Mensch (Ottander et al., 2000) wurde dieser Mechanismus der positiven Rückkoppelung postuliert. Voraussetzung ist die Expression des Progesteronrezeptors (PR) am Ort der Progesteronsbiosynthese. Hoffmann et al. (2004) zeigten mittels Immunhistochemie auf Proteinebene, dass der PR-Rezeptor im Cl des Hundes während des gesamten Zyklus exprimiert wird (Hoffmann et al., 2004). Auch Kowalewski et al. (2009) diskutierten eine positive autokrine Rolle von Progesteron. Nach der Behandlung trächtiger Hündinnen mit dem Antiprogestin Aglepristone wurde eine Downregulation der steroidogenen Enzyme StAR und 3 β HSD beobachtet (Kowalewski et al., 2009). Aufgrund dieser Beobachtung ist eine steroidogene/luteotrope Wirkung von Progesteron anzunehmen. Vermutlich bewirkt Progesteron über auto-/parakrine Mechanismen die Aufrechterhaltung des Cl und unterstützt damit gleichzeitig seine eigene Produktion.

Biosynthese und Regulationsmechanismen für das Progesteron werden unter 3.6 ausführlich besprochen.



— progesterone

.....estradiol 17β

po: proestrus

e: estrus

★ prepartal decline of progesterone and estradiol 17β

Abb. 3.3.1: Schematische Darstellung der Konzentrationskurven von Progesteron und Estradiol-17β bei der trächtigen und nicht trächtigen Hündin (Hoffmann et al. 1999)

3.3.2 Prolaktin (PRL) und Luteinisierendes Hormon (LH)

Wie bereits erwähnt, ist die Funktion des Cl beim Hund durch eine initiale Phase der gonadotropen Unabhängigkeit gekennzeichnet. Anschliessend wird Prolaktin zum essentiellen luteotropen Hormon, auf dessen Wegfall das kanine Corpus luteum mit einer Regression reagiert (Onclin et al., 1993). Onclin et al. (1997) sehen die Funktion des Prolaktin jedoch eher in der Verlangsamung der Gelbkörperregression, als in einer aktiven Stimulation der Progesteronsynthese (Onclin and Verstegen, 1997). Prolaktin scheint sowohl in der zyklischen als auch der trächtigen Hündin absolut für den Erhalt des Corpus luteum notwendig zu sein. Der Anstieg der Prolaktinkonzentrationen setzt jedoch bei der trächtigen Hündin bereits in der 5.-6. Woche ein (Graf, 1978) und damit deutlich früher als bei der nicht trächtigen Hündin. Dennoch ist Prolaktin als Trächtigkeitmarker beim Hund nicht einsetzbar, da die Prolaktinkonzentration im Plasma starken individuellen, tageszeitabhängigen und stressbedingten Schwankungen unterliegt (Okkens et al., 1990; Okkens et al., 1986). Die Serumkonzentration von Prolaktin, das für die Anbildung des Drüsengewebes der Mamma und die Milchsekretion verantwortlich ist (Freeman et al., 2000), nimmt bis zum Partus hin kontinuierlich zu und bleibt auch in der Laktationsperiode hoch.

Während der Einfluss von Prolaktin unerlässlich für den Erhalt des kaninen Gelbkörpers ist, scheint LH eine untergeordnete Rolle als luteotroper Faktor zu spielen. Die Injektion von Anti-LH-Antikörper in Hunde beeinflusste weder die Gelbkörperfunktion noch die Progesteronsynthese deutlich (Onclin and Verstegen, 1997). Eine essentielle Rolle für den Erhalt der Gelbkörperfunktion, wie bei Rind (Peters et al., 1994), Schwein (Buhr, 1987) und Pferd (Roser and Evans, 1983), konnte bisher nicht bewiesen werden. In vitro (Concannon, 1993) und in vivo (Onclin and Verstegen, 1997) wurde jedoch gezeigt, dass LH durchaus die Progesteronsekretion stimuliert. Onclin et al. postulierten 2000 eine indirekte Wirkung des LH auf das Corpus luteum als Mediator der Prolaktinsekretion (Onclin et al., 2000). LH könnte somit als luteotroper Kofaktor in der Regulation der Gelbkörperfunktion neben Prolaktin fungieren.

Trotz der grossen Bedeutung, die insbesondere Prolaktin beim Erhalt des Gelbkörpers zukommt, findet die luteale Regression oder die präpartale Luteolyse interessanterweise unter Anwesenheit erhöhter Konzentrationen von sowohl Prolaktin als auch LH im Serum statt (Graf, 1978). Auch die Rezeptoren für Prolaktin und LH werden während der gesamten Gelbkörperphase exprimiert (Fernandes et al., 1987). Kowalewski et al. (2011) konnten eine zeitabhängige Expression des PRL-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene im Cl der nicht trächtigen und trächtigen Hündin nachweisen. Während des nicht trächtigen Zyklus konnte die

höchste Expression des PRL-Rezeptors an Tag 15 p.o. gezeigt werden, anschliessend fand ein langsamer Abfall bis zum Tag 65 p.o. statt. Da dieses Expressionsmuster parallel zur Konzentrationskurve von Progesteron verläuft, vermuten die Autoren, dass die verminderte Expression des PRL-Rezeptors zur verringerten Responsivität des Gelbkörpers gegenüber PRL und somit zur Luteolyse führen könnte (Kowalewski et al., 2011). Eine Regulation auf Rezeptorebene würde eine Regression des Gelbkörpers trotz erhöhter PRL- und LH-Konzentrationen erklären.

3.3.3 Estradiol-17 β

Wie bereits beschrieben findet die Östrogensynthese in Abhängigkeit vom Zyklus hauptsächlich in den Granulosazellen der sich anbildenden Follikel statt. Die im Reproduktionsgeschehen biologisch aktive Form ist das Estradiol-17 β . Ebenso wie das Progesteron sind die Konzentrationsverläufe des Estradiols bei zyklischer und gravider Hündin nahezu identisch (Concannon et al., 1989) (Abb. 3.3.1). Mit Beginn des Proöstros steigen die Estradiolwerte im Serum, ausgehend von basalen 5-10 pg/ml, um schliesslich 1-3 Tage vor dem präovulatorischen LH-Peak Höchstkonzentrationen von 45-120 pg/ml zu erreichen (Concannon, 2009). Dass auch das Corpus luteum die Fähigkeit zur Estradiolsynthese besitzt, wurde bereits im Kapitel 3.2 kurz erwähnt. Zahlreiche Arbeiten haben sich bei verschiedenen Spezies mit der möglichen Funktion dieses lutealen Estradiols beschäftigt. So scheint Estradiol bei Ratte (Gibori and Keyes, 1978) und Kaninchen (Holt, 1989) zusammen mit PRL und LH regulierend auf den Gelbkörper zu wirken. Bei Schwein und Mensch wurde nachgewiesen, dass Estradiol die Progesteronsynthese fördert (Endo et al., 1998; Rajkumar et al., 1985). Steinetz et al. zeigten beim Hund einen kontinuierlichen Anstieg des Estradiols im Serum zwischen Tag 10 und 64 der Lutealphase (Steinetz et al., 1990). Diese Beobachtung spiegelt sich in immunhistochemischen Untersuchungen beim Hund wider, in denen die Anzahl aromatasepositiver Zellen im Cl des Hundes zwischen Tag 40 und 60 der Gravidität stieg (Nishiyama et al., 1999). Demgegenüber stehen jedoch Arbeiten von Hoffmann et al. (1990), in welchen deutlich wurde, dass im Gegensatz zu anderen Spezies wie Wiederkäuer, Schwein oder Pferd, beim Hund ein charakteristischer präpartaler Estradiolabfall stattfindet, welcher zeitgleich mit dem funktionellen Verlust des Gelbkörpers auftritt (Hoffmann, 1990). Dies spricht dafür, dass das Corpus luteum die primäre Produktionsstätte des Estradiols während der Trächtigkeit ist. Diese Hypothese wird von der Arbeit Onclins et al. (2002) unterstützt. Die Gruppe zeigte in trächtigen und nicht trächtigen Hündinnen, dass die Konzentration von Estradiol ab Tag 9 nach dem LH-Peak gleichbleibend während der gesamten Gelbkörperphase

erhöht ist (Onclin et al., 2002). Mit dem Ende der Lutealphase sinkt Estradiol auf Basalwerte ab. Es wird gefolgert, dass die ovarielle Estradiolproduktion möglicherweise an der Autoregulation der Gelbkörperfunktion beteiligt ist (Onclin et al., 2002). Papa et al. (2011) zeigten kürzlich, dass die Expression der Cytochrom P450scc Aromatase im Corpus luteum der zyklischen Hündin während der gesamten Lutealphase stattfindet, wobei eine Aufregulation am Tag 35 p. o. zu beobachten ist. Auch der Östrogenrezeptor ER α wurde während der gesamten Gelbkörperphase exprimiert, mit der höchsten Präsenz an Tag 25 p.o. (Papa and Hoffmann, 2011). Somit wurde gezeigt, dass das Corpus luteum des Hundes sowohl wichtige Produktionsstätte als auch Zielorgan von Estradiol ist. Dies verstärkt die Annahme, dass Estradiol auch beim Hund über para- oder autokrine Mechanismen luteotrop wirkt (Papa, 2001). Die zeitabhängige Expression von sowohl Aromatase als auch Estradiolrezeptor zeigt die Bedeutung der auto- und parakrinen Mechanismen besonders in der frühen und mittleren Cl- Phase und der Blüte des Gelbkörpers (höchste Sekretionsaktivität). Die genauen Einflüsse des Östradiols auf die Gelbkörperfunktion benötigen zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch weiterer Aufklärung.

3.3.4 Immunsystem und Zytokine

Zahlreiche Untersuchungen haben sich mit der Rolle des Immunsystems bei der Regulation der Gelbkörperfunktion beschäftigt. Dem Zeitraum der Luteolyse galt besonderes Interesse. Für zahlreiche Spezies wurde gezeigt, dass das Corpus luteum in dieser Periode verstärkt von Zellen des Immunsystems infiltriert wird. Für Ratte, Maus, Mensch, Schaf und Schwein konnte eine Zunahme von Makrophagen und Leukozyten nachgewiesen werden (Übersicht bei Niswender et al., 2000; Pate et al., 2010). Neben der Phagozytose degenerierter Zellen durch die Makrophagen (Bulmer, 1964) scheinen insbesondere die von den immunogenen Zellen freigesetzten Zytokine einen wesentlichen Effekt auf das Corpus luteum auszuüben. Speziell der Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interferon γ (IF γ) und Interleukin 1 β (IL-1 β) scheinen hauptsächlich über zytotoxische Effekte die Steroidogenese zu hemmen. Dies wurde vor allem bei Rind (Pate, 1995) und Schwein (Wuttke et al., 1998) beobachtet. Eine erhöhte intraluteale Produktion der oben genannten Zytokine scheint bei diesen Spezies auch die lokale Synthese von luteolytischem PGF $_2\alpha$ zu stimulieren.

Aber nicht nur luteolytische Effekte konnten nachgewiesen werden, Zytokine scheinen auch eine trophische Funktion auf den Gelbkörper auszuüben. So wurden stimulierende Effekte für die Interleukine 4, 8 und 10 beim Menschen nachgewiesen (Arici et al., 1996; Hashii et al., 1998).

Inwiefern Immunsystem und Zytokine auch beim Hund eine regulatorische Funktion einnehmen, ist noch nicht vollständig beleuchtet. Büsges et al. (2003) konnten eine erhöhte Anzahl CD8-positiver Lymphozyten und eine erhöhte Expression des MHC-II Antigens (Major histocompatibility complex II) in der Phase der lutealen Regression feststellen (Büsges, 2003). Hoffmann et al. (2004) beschrieben eine vermehrte Invasion von Immunzellen in den sich anbildenden Gelbkörper des Hundes. So scheinen auch beim Hund Zytokine aus CD4, CD8 und MHCII-Antigen-positiven Zellen stimulierend auf die Gelbkörperformation und Steroidogenese zu wirken. Dieser Effekt kann jedoch zwischen Tag 15 und 30 der Gelbkörperphase nicht beobachtet werden. Erst in der Phase der Regression ist beim Hund vergleichbar der Situation bei anderen Spezies wieder eine vermehrte Invasion von Immunzellen zu beobachten (Hoffmann et al., 2004). Auch die Expression der Zytokine IL-8, IL-10, IL-12, TNF α und TGF β 1 konnte im Gelbkörper des Hundes nachgewiesen werden (Engel et al., 2005). Genauere Details sind beim Hund zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch noch nicht bekannt und bedürfen der weiteren Untersuchung.

3.3.5 Prostaglandine

Prostaglandine wurden bereits mehrfach als wichtige auto- und parakrin wirkende Mediatoren in der Regulation der Fortpflanzung beschrieben. Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Rolle der Prostaglandine im Fortpflanzungsgeschehen der Hündin liegt, soll diese wichtige Stoffgruppe im Kapitel 3.5 detailliert besprochen werden.

3.4 Die Plazenta als endokrines Organ

Die Plazenta ist ein wichtiges endokrines Organ mit einer hohen Synthesefähigkeit für verschiedene Hormone. Es herrschen jedoch beträchtliche Speziesunterschiede hinsichtlich Menge und Art der produzierten Hormone. Grundsätzlich hat die Plazenta die Fähigkeit, sowohl Peptidhormone, Steroidhormone als auch Prostaglandine zu synthetisieren. Ihre Wirkung entfalten die plazentären Hormone entweder systemisch oder lokal über auto- und parakrine Mechanismen (Siegenthaler, 2006). Ein kurzer Überblick über die wichtigsten Faktoren bei verschiedenen Spezies soll in diesem Kapitel gegeben werden.

Bei zahlreichen Spezies wird die Plazenta im Laufe der Gravidität zur Produktionsstätte von Progesteron. Hierbei geht die Progesteronsynthese speziesabhängig ganz oder teilweise auf die Plazenta über. Während beim Rind die Plazenta eine zusätzliche potente Progesteronquelle neben dem Corpus luteum darstellt (Schuler et al., 2008), geht bei Schaf und Mensch die

Progesteronsynthese bereits in der frühen Trächtigkeit sogar vollständig auf die Plazenta über (Moore et al., 1972; Simpson and MacDonald, 1981).

Neben Progesteron ist das plazentäre Laktogen (bovine Placental Lactogen, bPL) ein wichtiges Produkt der bovinen Plazenta. Plazentäres Laktogen ist ein in den Trophoblastzellen synthetisiertes Glycoprotein mit struktureller und funktioneller Verwandtschaft zur Familie der Wachstumshormone und Prolaktin (Übersicht bei Alvarez-Oxiley et al., 2008). Neben einer mammogenen und laktogenen Wirkung scheint es beim Rind als luteotroper Faktor zu fungieren (Übersicht bei Soares, 2004).

Beim Pferd bilden sich unter dem Einfluss plazentären eCG's (equines Choriongonadotropin) neben dem primären Cl zur zusätzlichen Progesteronsynthese Corpora lutea auxiliaria aus. Das ab Tag 35 produzierte eCG stammt aus den sogenannten Endometrial Cups, welche sich durch die Einwanderung von fetalen Trophoblastzellen ins Endometrium bilden (Allen and Stewart, 2001). Somit stellt die Plazenta beim Pferd ein luteotropes Organ dar. ECG wird nach Höchstkonzentrationen zwischen Tag 60 und 80 bis zum Partus im peripheren Blut nachgewiesen (Hoppen, 1994). Ab Tag 100 sezerniert beim Pferd das Allantochorion Progesteron, womit die Plazenta die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Trächtigkeit erlangt (Allen and Stewart, 2001; Silver, 1994).

Ebenso wie beim Pferd werden beim Menschen in der Plazenta luteotrope Faktoren gebildet. Dem eCG beim Pferd ist das humane Choriongonadotropin (hCG) in Struktur und Wirkung sehr ähnlich. Es wird von den Synzytiotrophoblastzellen gebildet und bindet an den LH-Rezeptor (Jameson and Hollenberg, 1993). Allerdings übernimmt es beim Menschen im Unterschied zum Pferd seine luteotrope Rolle in der Frühgravidität und wird in vitro bereits ab Tag 7 nach der Fertilisation von der Blastozyste produziert (Hay and Lopata, 1988). Beim Menschen verliert das Cl graviditatis seine Funktionsfähigkeit ab der siebten Schwangerschaftswoche, womit die Progesteronsynthese wie bereits erwähnt vollständig auf die Plazenta übergeht (Tulchinsky and Hobel, 1973). Nach hCG-Höchstwerten im ersten Trimester sinkt die hCG-Konzentration auf ein niedriges Basalniveau, welches bis zur Geburt nachgewiesen werden kann (Braunstein et al., 1976).

Hiermit wird deutlich, dass die Plazenta bei zahlreichen Spezies wichtige Funktionen entweder als luteotropes Organ oder aber als Produktionsstätte für das Progesteron übernimmt. Der Hund unterscheidet sich hierin jedoch von den geschilderten Spezies. Wie bereits früher erwähnt ist das Corpus luteum beim Hund die einzige Progesteronquelle während der gesamten Trächtigkeit (Concannon et al., 1989). Dass Uterus und Plazenta jedoch auch beim Hund als Produktionsstätte für die Prostaglandine Bedeutung haben, wird in Kapitel 3.5.3.2 dargestellt.

Die Rolle uterinen bzw. plazentären $\text{PGF}_2\alpha$ im Rahmen von Luteolyse und Wehentätigkeit wird im Kapitel 3.5.2.2 erläutert, wobei die Luteolyse beim Hund gesondert im Kapitel 3.5.3.2 beschrieben wird.

3.5 Die Rolle von Prostaglandinen im Reproduktionsgeschehen

Prostaglandine wurden 1930 von Euler erstmals aus Samenflüssigkeit und Prostata isoliert und erhielten daher ihren Namen: Prosta-glandine, angelehnt an das englische Wort „prostate gland“. Prostaglandine sind von der Arachidonsäure abgeleitete Gewebshormone, die in sämtlichen Geweben und Organen des Körpers gebildet werden. Sie üben als lokale Mediatoren über sekundäre Botenstoffe (Secondmessengersysteme) verschiedene Funktionen im Körper aus (Nelson, 2011). So sind sie an Schmerzvermittlung, Fieberentstehung und Entzündungsprozessen beteiligt, spielen aber auch eine essentielle Rolle bei zahlreichen physiologischen Vorgängen im Körper. Auch im Fortpflanzungsgeschehen fällt den Prostaglandinen sowohl im männlichen als auch im weiblichen Organismus eine Schlüsselrolle zu (Übersicht bei Nelson, 2011). Beim weiblichen Individuum sind sie unter anderem an der Ovulation, der Befruchtung und der Implantation beteiligt, sie sind essentiell für den physiologischen Verlauf der Trächtigkeit und ausschlaggebend für Luteolyse und Wehentätigkeit und ermöglichen somit die Geburt (Simmons et al., 2004).

3.5.1 Prostaglandinbiosynthese

Wie bereits erwähnt leiten sich sämtliche Prostaglandine ebenso wie die Thromboxane, Leukotriene und Prostazykline von der Arachidonsäure ab und bilden mit den anderen genannten Substanzen die Gruppe der Eicosanoide (Übersicht bei Nelson, 2011).

Die Arachidonsäure ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen. Sie kann bei Bedarf durch die Aktivität der Phospholipase A_2 aus Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt werden. Aus dem Vorläufermolekül Arachidonsäure wird über die instabile Zwischenform des PGG_2 das PGH_2 synthetisiert (Hamberg et al., 1974; Smith and Lands, 1972). Zuständig für diese Reaktion ist das Enzym Cyclooxygenase (COX), welches in zwei Formen vorliegt: der konstitutiven Form Cyclooxygenase-1 (COX1), welche in sämtlichen Geweben des Körpers vorkommt und der induzierbaren Form Cyclooxygenase-2 (COX2), welche nur unter bestimmten Umständen, wie beispielsweise bei Entzündungsreaktionen, Tumorwachstum oder unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren exprimiert wird (Herschman, 1996). Produkt ist in beiden Fällen PGH_2 , welches als Zwischenform durch verschiedene Prostaglandinsynthasen in einem weiteren Schritt in die jeweilige Endform

überführt wird. So ist beispielsweise die PGE-Synthase für die Synthese von PGE₂ zuständig (Simmons et al., 2004; Wiltbank et al., 1993) (Abb. 3.5.1).

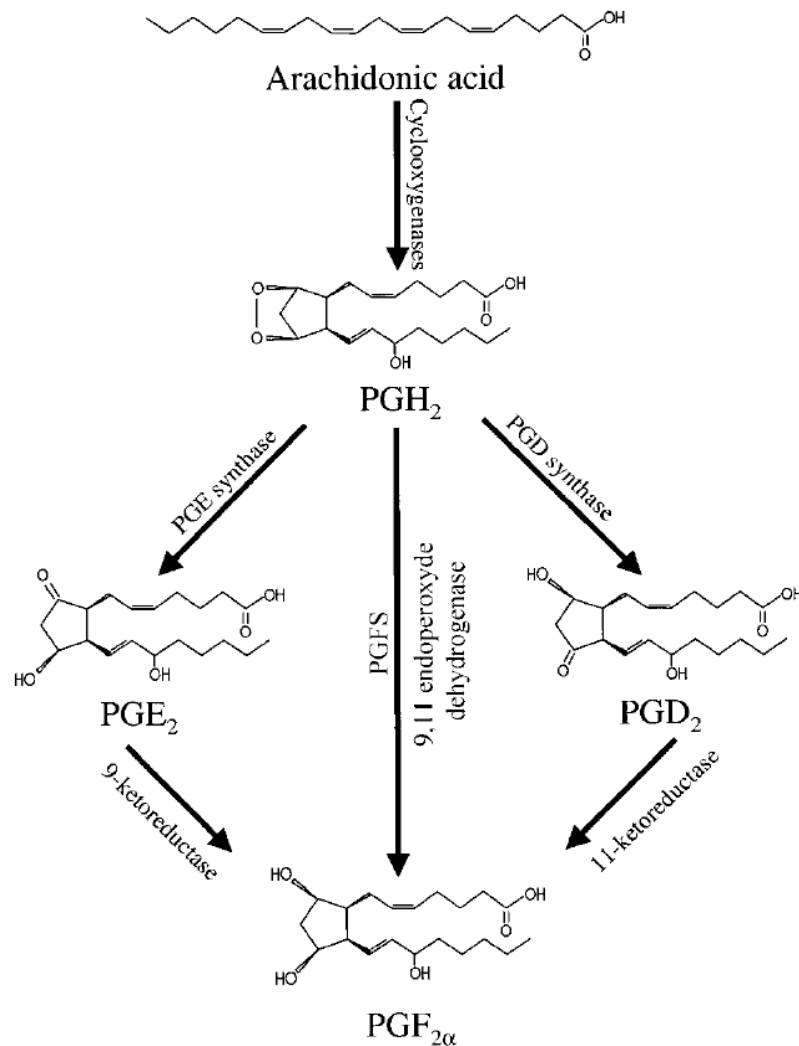


Abb. 3.5.1: Synthesewege von PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} (Madore et al., 2003)

3.5.2.1 Prostaglandin E₂ (PGE₂)

Wie bereits erwähnt wird PGE₂ durch die PGE-Synthase aus PGH₂ synthetisiert und ist somit ein Downstreamprodukt der Arachidonsäurekaskade. PGE₂ ist an vielen verschiedenen Vorgängen im Organismus von Mensch und Säugetier beteiligt. So unterstützt es beispielsweise Gewebeproliferation und Mitogenese, Angiogenese, wirkt antiapoptotisch und verursacht Vasodilatation und die Relaxation glatter Muskulatur (Arosh 2004).

Für die Vermittlung der Wirkung von PGE₂ sind die Prostaglandin E₂-Rezeptoren zuständig, die als EP bezeichnet werden und in 4 Isoformen eingeteilt werden (EP1- 4). Zwar sind alle

Isoformen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihres Signaltransduktionsweges und initiieren individuelle, teils sogar gegensätzliche Reaktionen auf zellulärer Ebene (Narumiya et al., 1999). Während EP-1 als kontraktionsvermittelnder und EP-3 als inhibitorischer Rezeptor eingestuft werden, sind EP-2 und EP-4 relaxierende Rezeptoren (Arosh et al., 2003). EP-1 aktiviert die Phospholipase C und vermittelt seine Wirkung anschliessend entweder über IP_3 -Signaltransduktion (Inositoltriphosphat verbunden mit einer intrazellulären Kalziumfreisetzung) oder über die Aktivierung der Proteinkinase C durch Diacylglycerol (Arosh et al., 2004).

Der Hauptsignaltransduktionsweg von EP-3 ist die Hemmung der Adenylatzyklase via G_i und somit Senkung der intrazellulären cAMP-Level. Unterschiedliche Spleissvarianten des EP-3 sind jedoch mit verschiedenen weiteren Signaltransduktionskaskaden verküpft und vermitteln somit unterschiedlichste Wirkungen (Narumiya et al., 1999). EP-2 und EP-4 sind adenylatzyklasegekoppelte Rezeptorsubtypen und aktivieren über cAMP die Proteinkinase A, welche ihrerseits zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren führt (Arosh et al., 2003) (Abb. 3.5.2.1). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Behandlung von Geweben des Reproduktionstraktes mit PGE_2 mit einer cAMP- Erhöhung einhergeht, weshalb man auf eine vorrangige Bedeutung der Rezeptoren EP-2 und EP-4 im Fortpflanzungsgeschehen rückschliesst (Arosh et al., 2003). Durch die PGE_2 -induzierte Aktivität der Proteinkinase wird die StAR-Expression reguliert. Dies geschieht über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, welche über eine Interaktion mit dem StAR-Promotor zu einer erhöhten Expression des StAR-Gens führen (Sun et al., 2003). Die erhöhte Expression von StAR führt ihrerseits durch die verstärkte Substratbereitstellung zu einer erhöhten Steroidogenese. Die Eigenschaften von StAR, seiner Promotorregion und mögliche beteiligte Transkriptionfaktoren werden im Kapitel 3.6 detailliert dargestellt.

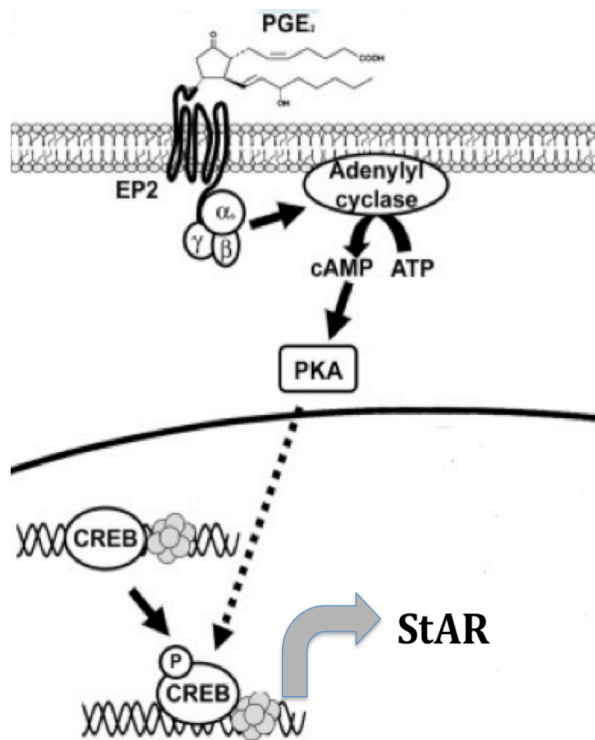


Abb. 3.5.2.1: Signaltransduktion nach Stimulation des Rezeptors EP-2
(modifiziert nach Hsu, Lu et al. 2008)

3.5.2.1.1 Die systemische Wirkung von PGE₂ im Verlauf der Trächtigkeit

Obwohl PGE₂ in vielen Geweben des Körpers unterschiedliche Wirkung entfaltet, soll hier nur auf seine Bedeutung im weiblichen Reproduktionsgeschehen eingegangen werden.

Bereits bei der Ovulation, der sich anschliessenden Fertilization und der Implantation scheint PGE₂ eine grundlegende Rolle zuzukommen. Gezeigt wurde dies an verschiedenen Versuchen mit EP-2-Knockoutmäusen, welche im Vergleich zur Kontrollgruppe stets kleinere Würfe entwickelten (Kennedy et al., 1999; Tilley et al., 1999). Verschiedene Autoren machen hierfür unterschiedliche Vorgänge verantwortlich. Während Kennedy et al. (1999) neben einer reduzierten Anzahl ovulierter Follikel sowohl weniger befruchtete Eizellen als auch eine geringere Anzahl von Implantationsstellen bei den Knockouttieren im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellten (Kennedy, Zhang et al. 1999), beobachteten Tilley et al. (1999) zwar eine normale Ovulationsrate, jedoch eine deutlich niedrigere Fertilität bei den EP-2-negativen Tieren (Tilley, Audoly et al. 1999). Die Gruppe zeigte in verschiedenen Versuchen, dass PGE₂ höchstwahrscheinlich für die Ausbildung eines geeigneten Milieus im Ovidukt verantwortlich ist, welches die Fertilisation ermöglicht (Tilley et al., 1999). Hizaki et al. (1999) beobachteten weiterhin, dass die Cumulusoozytenkomplexe genetisch unveränderter Mäuse die Stimulation mit PGE₂ mit einer Expansion beantworteten, während die

Cumulusoozytenkomplexe EP-2-negativer Mäuse in vitro nicht auf die Stimulation reagierten (Hizaki, Segi et al. 1999). Die Beobachtungen der verschiedenen Autoren zeigen die Bedeutung von PGE₂ im Präimplantationszeitraum und während der Implantation.

Neben seiner Bedeutung im frühen Trächtigkeitszeitraum nimmt PGE₂ um den Geburtszeitraum wichtige Funktionen ein. Im präpartalen Zeitraum fördert PGE₂ die Zervixreifung (Hughes et al., 2001) und auch beim Neonaten werden essentielle Reifungsvorgänge von PGE₂ beeinflusst. So findet beispielsweise die Adaptation des kardiovaskulären Systems beim Neugeborenen durch sein Einwirken statt (Simmons et al., 2004; Nguyen et al., 1997). Die wichtige Bedeutung von PGE₂ als luteotroper Faktor wird im folgenden Kapitel dargestellt.

3.5.2.1.2 Die Bedeutung von PGE₂ als auto- und parakriner Regulationsfaktor der Gelbkörperfunktion

Bereits seit den 1970ern wird die Bedeutung von PGE₂ als luteotroper Faktor bei verschiedenen Spezies postuliert. Pratt et al. (1977) beobachteten, dass PGE₂-Infusionen in die Uterushörner von Schafen die Lebensspanne des Gelbkörpers verlängerten (Pratt et al., 1977). Magness et al. (1981) stellten in einem ähnlichen Versuch an Schafen die Vermutung auf, dass PGE₂ über lokale Mechanismen seine Wirkung entfaltet, da bei einer unilateralen intrauterinen Gabe von PGE₂ nur die Lebensdauer des ipsilateral lokalisierten Gelbkörpers verlängert werden konnte (Magness et al., 1981). Bis zur Gegenwart wurde die luteotrope Wirkung von PGE₂ in zahlreichen weiteren Spezies nachgewiesen. So wurde unter anderem für den Menschen (Marsh and LeMaire, 1974; Vijayakumar and Walters, 1983), das Kaninchen (Boiti et al., 2001) und das Schaf (Weems et al., 1997) gezeigt, dass PGE₂ zum Erhalt des Gelbkörpers beiträgt und die Progesteronsynthese mit einer Effizienz fördert, welche der von LH vergleichbar ist. Arosh et al. (2004) zeigten die Bedeutung auto- bzw. parakriner Mechanismen in der Gelbkörperfunktion und konnten insbesondere auf die Beteiligung von PGE₂ hierbei hinweisen: Eine hohe Expression von sowohl COX2, PGES und der PGE₂ Rezeptoren EP-2 und EP-3 wurde im wachsenden Corpus luteum des Rindes nachgewiesen. Diese Ausstattung verdeutlicht, dass das frühe Corpus luteum sowohl Produktionsstätte als auch Wirkort des PGE₂ ist (Arosh et al., 2004). Inwiefern beim Hund auto- und parakrine PGE₂-vermittelte Mechanismen eine Bedeutung haben, wird gesondert unter 3.5.3.1 diskutiert.

3.5.2.2 Prostaglandin $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$)

Wie PGE_2 wird $PGF_2\alpha$ aus der Vorstufe PGH_2 synthetisiert. Das zuständige Enzym ist die 9,11-Endoperoxidase-Reduktase, auch PGF-Synthase (PGFS) genannt. Neben diesem Hauptweg für die Synthese von $PGF_2\alpha$ gibt es aber zwei weitere Synthesewege: Erstens über PGE_2 als Zwischenstufe, welches durch die 9-Ketoreduktase in $PGF_2\alpha$ umgewandelt wird und zweitens über PGD_2 , welches durch die 11-Ketoreduktase zu $PGF_2\alpha$ prozessiert wird (Madore et al., 2003).

$PGF_2\alpha$ übt seine Wirkung über den PGF-Rezeptor (FP) aus, welcher ein Siebentransmembranrezeptor ist und für zahlreiche Spezies kloniert wurde, wie z.B für den Hund (Kowalewski et al., 2008b), das Rind (Sakamoto et al., 1994) und den Menschen (Abramovitz et al., 1994).

Im Reproduktionstrakt sind die wichtigsten Zielorgane des $PGF_2\alpha$ das Corpus luteum und der Uterus. $PGF_2\alpha$ ist ein potenter luteolytischer Faktor, welcher den Funktionsverlust des Corpus luteum einleitet. Die Synthese von Progesteron nimmt dabei ab und kommt schliesslich zum Erliegen, was mit strukturellen Veränderungen im Sinne einer fortschreitenden Degeneration von Luteinzellen einhergeht. Durch den im Rahmen der Luteolyse eintretenden Konzentrationsabfall des Progesterons wird beim trächtigen Tier die Geburt eingeleitet (Chedrese, 2009). Beim Rind konnte der $PGF_2\alpha$ -Rezeptor auch in Endothelzellen von Kapillaren des Corpus luteum nachgewiesen werden, was eine Rolle von $PGF_2\alpha$ bei der Regulation der Durchblutung dieses Organs vermuten lässt (Mamluk et al., 1998). Weiterhin werden Effekte auf die Kommunikation zwischen Zellen und die Zelldifferenzierung diskutiert (Wiltbank and Ottobre, 2003).

Bei den meisten Säugetieren wird der Prozess der Luteolyse durch $PGF_2\alpha$ aus dem Endometrium eingeleitet (McCracken et al., 1970; Milvae and Hansel, 1983; Olofsson and Leung, 1994; Patek and Watson, 1983; Wiltbank and Ottobre, 2003). So führt die Hysterektomie bei Schwein, Wiederkäuer, Meerschweinchen und vielen anderen Spezies zu einer Verzögerung der Luteolyse bzw. einem Corpus luteum persistens (Anderson et al., 1966; Heap et al., 1967; Wiltbank, 1956). Beim Rind wird angenommen, dass neben dem Endometrium die uninukleären Trophoblastzellen der Kotyledone, also der fetale Teil der Plazenta, zur $PGF_2\alpha$ -Synthese beiträgt (Schuler et al., 2006). Trotz der Bedeutung des Uterus als Produktionsstätte von $PGF_2\alpha$, konnte beim Rind während der gesamten Trächtigkeit ebenfalls eine intraluteale $PGF_2\alpha$ -Synthese nachgewiesen werden (Diaz et al., 2002). Es wird angenommen, dass dieses intraluteale $PGF_2\alpha$ seine Wirkung lokal auf Blutfluss und Zelldifferenzierung im Corpus luteum ausübt (Wiltbank and Ottobre, 2003). Dieses am Ort

seiner Synthese wirkende $\text{PGF}_2\alpha$ erhärtet die Vermutung, dass lokal produzierte Prostaglandine wichtige Faktoren in der Autoregulation der Gelbkörperfunktion darstellen.

Neben seiner Wirkung auf die Ovarien ist $\text{PGF}_2\alpha$ aber auch für die Myokontraktilität des Uterus zum Zeitpunkt des Partus verantwortlich und hat somit neben seiner geburtsauslösenden Funktion eine entscheidende Rolle in der Phase der Austreibung (Allport, 2001). FP-Knockoutmäuse wiesen einen Verlust der myometrialen Kontraktionsfähigkeit auf und waren somit zur physiologischen Geburt nicht fähig (Sugimoto et al., 1997).

Die Herkunft und Bedeutung von $\text{PGF}_2\alpha$ in der Fortpflanzung des Hundes werden im folgenden Kapitel beschrieben.

3.5.3 Die Rolle von Prostaglandinen im Fortpflanzungsgeschehen der Hündin: PGE_2 und $\text{PGF}_2\alpha$

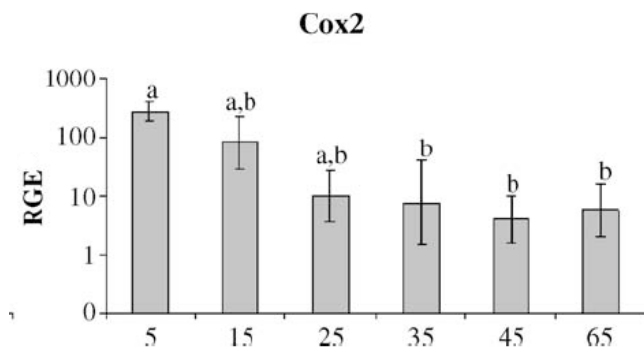
In den vorhergehenden Kapiteln wurde deutlich, welche bedeutende Rolle Prostaglandine zu verschiedenen Zeitpunkten im Fortpflanzungsgeschehen spielen. Zum einen scheinen im frühen Stadium der Trächtigkeit Prostaglandine über auto- und parakrine Mechanismen wichtige luteotrope Funktionen zu übernehmen. Zum anderen sind Luteolyse und Wehentätigkeit entscheidende prostaglandinvermittelte Ereignisse im Fortpflanzungsgeschehen.

3.5.3.1 Prostaglandin E_2 (PGE_2)

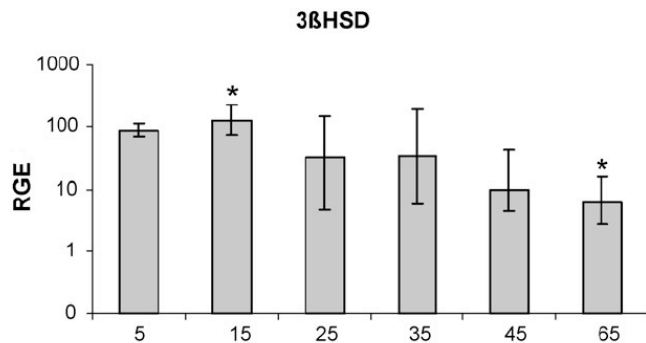
Der Frage, ob das Prinzip der Autoregulation des CI auch für den Hund gilt, widmeten sich Kowalewski et al. (2006). Sie zeigten, dass COX2 die höchste Expression zu Beginn des Diöstros aufweist und anschliessend stark abfällt (Kowalewski et al., 2006b). Dieser Hinweis auf die Bedeutung von Prostaglandinen in der Phase der Formation des Gelbkörpers wurde in Folgeexperimenten der gleichen Gruppe bestätigt. Das Expressionsmuster der Prostaglandin E_2 -Synthase (PGES) und der Rezeptoren EP-2 und EP-4 wurde auf mRNA-Ebene untersucht. Während EP-4 im Laufe der gesamten CI-Phase gleichermassen exprimiert wurde, konnte für PGES und EP-2 ein eindeutig zeitabhängiger Verlauf mit der höchsten Expression an Tag 15 post ovulationem und einer signifikanten Downregulation in der Phase der Gelbkörperregression an den Tagen 45 und 65 festgestellt werden (Abb. 3.5.3.1.a). Durch In-situ-Hybridisierung wurde eine Kolo-kalisation der Signale für PGES und EP-2 und EP-4 in den Lutealzellen gezeigt (Kowalewski et al., 2008a). Im trächtigen Tier wurde ein ähnliches Profil gezeigt. COX2 und PGES wiesen hier die höchste Expression im Zeitraum der Präimplantation und somit ebenfalls in der frühen Gelbkörperphase auf (Kowalewski et al., 2009) (Abb.

3.5.3.1.b). Unterstützend kommt hinzu, dass sowohl das StAR-Protein als auch 3 β HSD, zwei wichtige Regelfaktoren der Steroidogenese, in diesem frühen Zeitraum der Gelbkörperphase sowohl bei trächtigen als auch zyklischen Tieren die stärkste Expression zeigen (Kowalewski et al., 2009; Kowalewski and Hoffmann, 2008; Kowalewski et al., 2006a) (Abb. 3.5.3.1.a und b). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass beim Hund auto- und parakrine Mechanismen insbesondere während der Phase der Anbildung eine Schlüsselrolle in der Regulation der Gelbkörperfunktion spielen. Dies stellt ein Erklärungsmodell für die besondere Tatsache dar, dass das Corpus luteum beim Hund in der frühen Cl-Phase unabhängig vom Einfluss gonadotroper Regelfaktoren zu sein scheint. Es ist Teil dieser Arbeit, durch weitere Versuche zu bestätigen, dass PGE₂ über lokale Mechanismen im ersten Drittel der Trächtigkeit den Erhalt des Gelbkörpers sicherstellt.

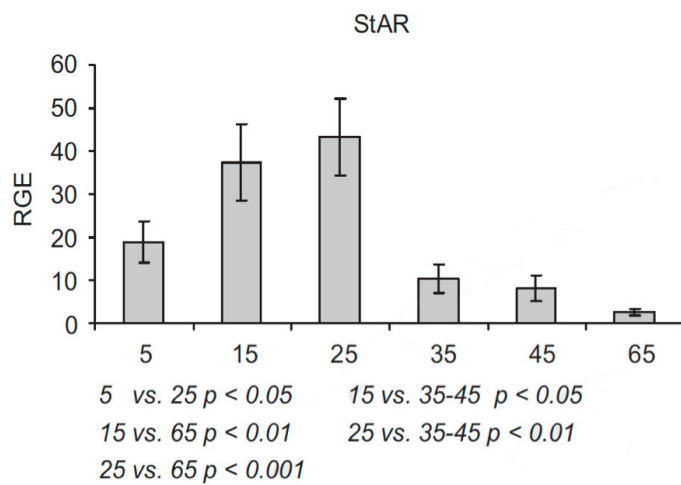
Inwiefern lokal produziertes PGE₂ seinen Einfluss auf die Steroidogenese über die Expression von StAR oder die Expression der beteiligten Enzyme ausübt, ist ein weiterer Aspekt, der untersucht werden soll. Die Rolle des StAR-Proteins bei der Regulation der Steroidogenese wird in den Kapiteln 3.6.2 ff ausführlich beschrieben.



Säulen mit unterschiedlichen
Buchstaben unterscheiden sich mit
 $p < 0,05$
(Kowalewski et al. 2006)



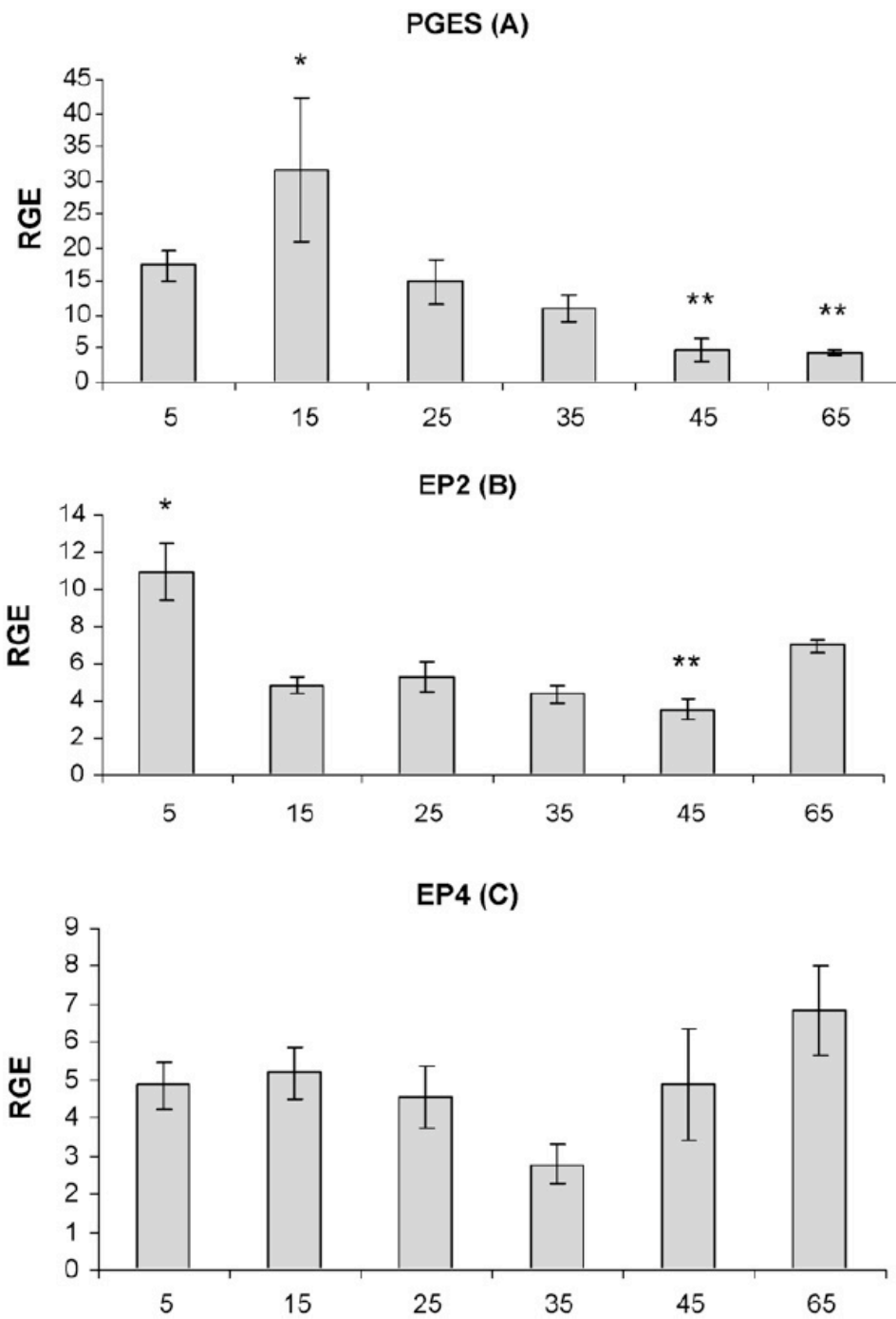
Säulen mit Asterisk unterscheiden
sich mit $p < 0,05$
(Kowalewski et al., 2006a)



(Kowalewski and Hoffmann, 2008)

Abb. 3.5.3.1.a

Abb. 3.5.3.1.a und b: Übersicht über die Expression von COX2, 3βHSD, StAR, PGES und EP-2/EP-4 in der nicht trächtigen Hündin auf mRNA-Ebene an den Tagen 5 – 65 p.o. (RGE=relative gene expression)



(Kowalewski et al., 2008a)

Abb. 3.5.3.1.b

Säulen mit unterschiedlichen Asterisks unterscheiden sich mit $p < 0,05$

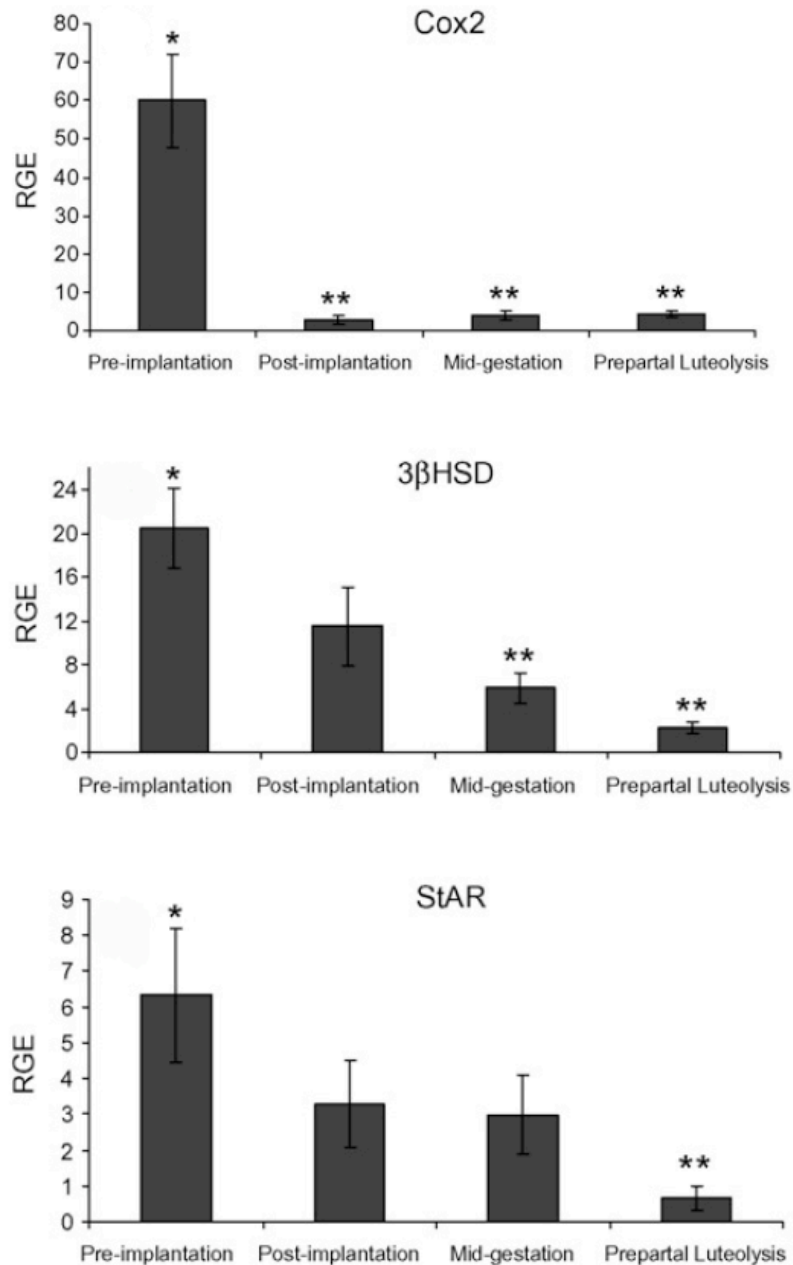


Abb.3.5.3.1.c

Säulen mit unterschiedlichen Asterisks unterscheiden sich mit $p < 0,01$ (3bHSD) und $p < 0,05$ (StAR), Säulen mit unterschiedlichem Asterisks unterscheiden sich mit $p < 0,001$ (COX₂)

Abb. 3.5.3.1.c und d: Übersicht über die Expression von COX2, 3βHSD, StAR, PGES und EP-2/EP-4 in der trächtigen Hündin auf mRNA-Ebene während Trächtigkeit und Luteolyse (RGE=relative gene expression) (Kowalewski, Beceriklisoy et al. 2009)

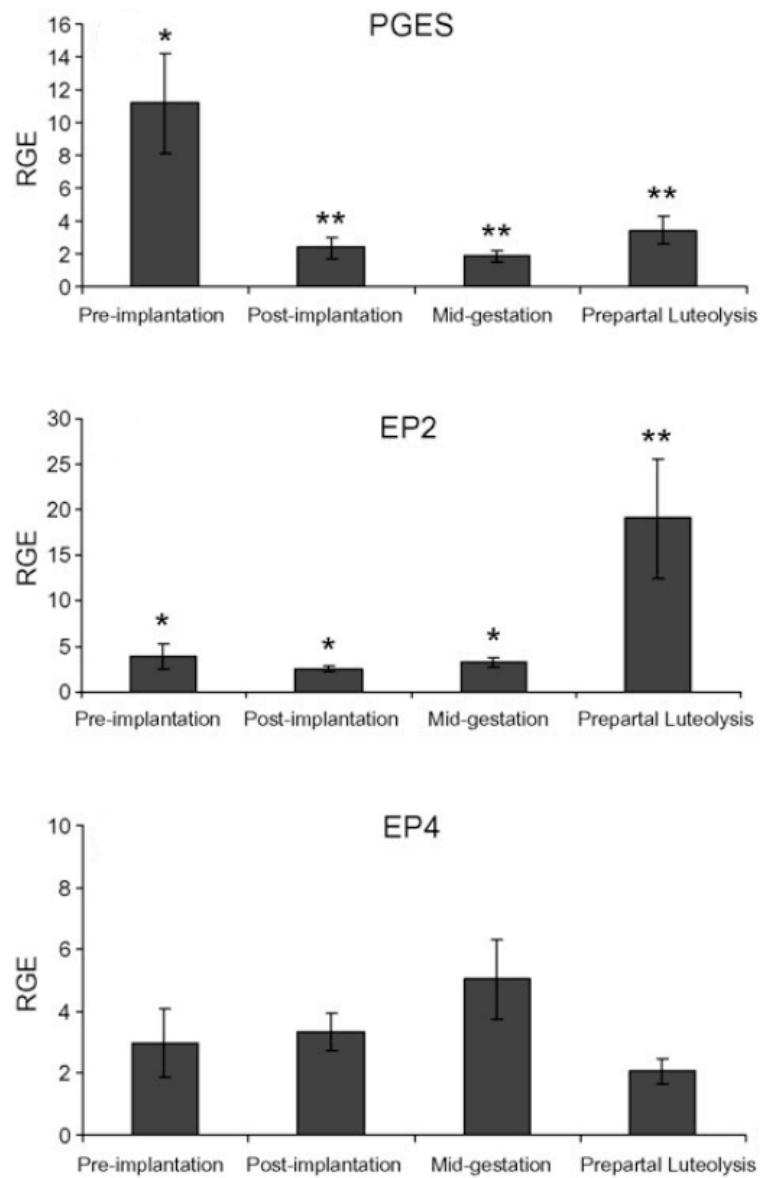


Abb. 3.5.3.1.d

Säulen mit unterschiedlichen Asterisks unterscheiden sich mit $p < 0,01$

3.5.3.2 $\text{PGF}_2\alpha$

Für den Hund wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu vielen anderen Spezies kein uterines Luteolysin existiert. Dies wurde aus Versuchen geschlossen, bei denen eine Hysterektomie zu keinen Abweichungen im Zyklus geführt hat (Hoffmann et al., 1992; Olson et al., 1984). Die Vermutung, dass ovariell $\text{PGF}_2\alpha$ über auto- und parakrine Mechanismen, wie beispielsweise für das Rind und das Schwein (Wiltbank and Ottobre, 2003) beschrieben, zur lutealen Regression führt, konnte beim Hund nicht bestätigt werden, da die PGFS nicht oder nur zu einem geringen Anteil im kaninen Corpus luteum exprimiert wird (Kowalewski et al., 2008a). Dennoch ist ein luteolytischer Effekt am Corpus luteum des Hundes bei systemischer Applikation von $\text{PGF}_2\alpha$ -Agonisten zu beobachten (Concannon et al., 1977; Romagnoli et al., 1991; Williams et al., 1999). Eine Luteolyse kann ab Tag 5 des Diöstrus induziert werden, allerdings sind sehr hohe Dosen oder wiederholte Anwendungen notwendig, um diesen Effekt auszulösen, was stets mit beträchtlichen Nebenwirkungen wie Erbrechen, Diarrhoe, Hecheln und Hypothermie einhergeht (Romagnoli et al., 1991). Die Ansprechbarkeit des Corpus luteum auf Gaben von $\text{PGF}_2\alpha$ -Agonisten ist auf die konstitutive Expression des $\text{PGF}_2\alpha$ -Rezeptors (FP) im Corpus luteum ab Tag 5 post ovulationem zurückzuführen (Kowalewski et al., 2008b). Zwar findet zu diesem Zeitpunkt noch eine relativ schwache Expression von FP statt, eine verstärkte Expression ist an Tag 25 p.o. zu beobachten, mit konstanten Signalen bis zur Luteolyse (Kowalewski et al., 2008b). Dieses Expressionsmuster unterstützt die Aussage, dass das Cl der Hündin in der frühen Lutealphase resistenter gegenüber $\text{PGF}_2\alpha$ ist als zu späteren Zeitpunkten (Watts et al., 2001). Aufgrund der um Tag 63 voneinander abweichenden Progesteronkurve bei zyklischen im Vergleich zu trächtigen Hündinnen, wurde davon ausgegangen, dass unterschiedliche Mechanismen der Luteolyse zum Tragen kommen (Concannon et al., 1988). Während bei zyklischen Hündinnen das Progesteronniveau kontinuierlich auf anöstrische Werte sinkt, ist bei graviden Tieren ein rapider Einbruch im präpartalen Zeitraum zu beobachten. Dieser steile Abfall der Progesteronkurve fällt zeitgleich mit einem Anstieg des $\text{PGF}_2\alpha$ im peripheren Blut (Nohr et al., 1993) (Abb. 3.5.3.2). Für trächtige Tiere scheint die Luteolyse somit ein aktiver, $\text{PGF}_2\alpha$ -vermittelter Prozess, dem anderer Spezies vergleichbar, zu sein.

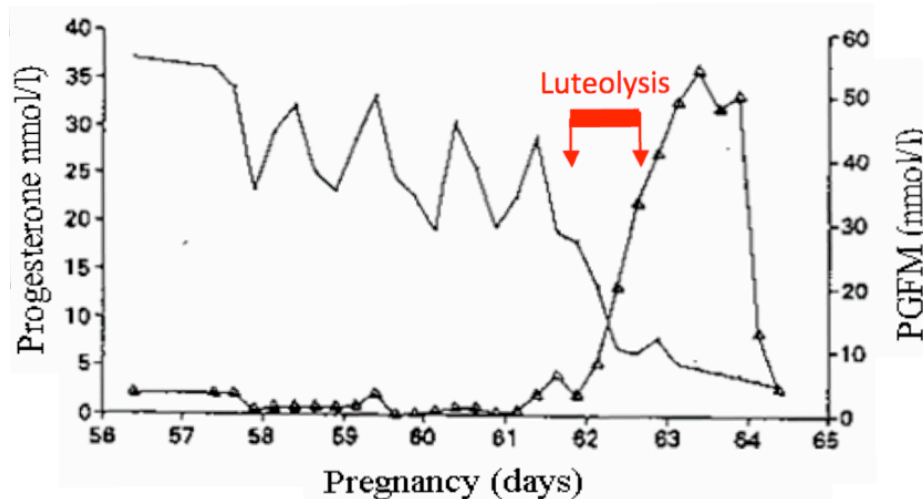


Abb. 3.5.3.2: Verlauf der Progesteron- (● -- ●) und PGFM- (PGF₂α-Metabolite) (▲ -- ▲) Konzentrationen im Plasma der Hündin im peripartalen Zeitraum (Nohr et al., 1993)

Da bisher keine Daten für den Hund bezüglich der Herkunft des präpartalen PGF₂α-Anstiegs vorhanden waren, untersuchten Kowalewski et al. (2009) die Ausstattung von Uterus und Plazenta mit den Komponenten des Prostaglandinsystems zu verschiedenen Zeitpunkten der Trächtigkeit. Im präpartalen Zeitraum konnte mittels RT-PCR und Immunhistochemie eine verstärkte Expression der COX2 in Uterus/Plazenta nachgewiesen werden, zeitgleich fand eine Konzentrationssteigerung von 15-Ketohydro-PGF₂α, einem PGF₂α-Metaboliten, im peripheren Blut statt. Allerdings ist die mRNA-Expression der PGFS in der Postimplantationsphase und mittleren Trächtigkeit höher als im präpartalen Zeitraum (Kowalewski et al., 2009). Es wurde diskutiert, dass dies möglicherweise seinen Grund in einer verstärkten Substratumsetzung hat (Kowalewski et al., 2010). Um weitere Aussagen treffen zu können, muss jedoch erst das Expressionsmuster der PGFS auf Proteinebene untersucht werden. Da allerdings präpartal eine signifikante Aufregulation der PGES gezeigt werden konnte (Kowalewski et al., 2010), stellt sich die Frage, ob das präpartal synthetisierte PGE₂ als Substrat für die Synthese von PGF₂α dienen könnte und letzteres somit, wie beim Rind beschrieben (Madore et al., 2003), über einen alternativen Syntheseweg entstehen könnte. Diese Fragestellung bedarf weiterer Aufklärung und ist Gegenstand der aktuellen Forschung unserer Gruppe.

Die immunhistochemische Färbung lokalisierte die COX2 zum Zeitpunkt der Luteolyse in den fetalen Trophoblastzellen (Kowalewski et al., 2010). Dies weist darauf hin, dass der Ort der Synthese des luteolytischen PGF₂α höchstwahrscheinlich die fetalen Trophoblastzellen der kaninen Plazenta sind (Kowalewski et al., 2010). Als Trigger für die präpartale Synthese des PGF₂α werden Mechanismen der Zell-Zellkommunikation zwischen fetalen Trophoblastzellen

und maternalen Dezidualzellen angenommen. Nach einer Behandlung mit dem Progesteronrezeptorblocker Aglepristone zeigten Kowalewski et al. eine Aktivierung des Prostaglandinsystems in den fetalen Trophoblastzellen, wie es während der präpartalen Luteolyse stattfindet (Kowalewski et al., 2010). Da die maternalen Dezidualzelle in der Plazenta als einziger Zelltyp den Progesteronrezeptor exprimieren (Vermeirsch et al., 2000), wird angenommen, dass sie wichtige Signalfunktion in der Vermittlung des präpartal stattfindenden Progesteronabfalls einnehmen, welcher zur Aktivierung des Prostaglandinsystems und zur Produktion von luteolytischem $\text{PGF}_2\alpha$ führt (Kowalewski et al., 2010).

Während die Bedeutung der Plazenta als Quelle präpartal freigesetzter Prostaglandine kaum bestreitbar ist und klare Hinweise auf einen aktiven Mechanismus der Luteolyse des Trächtigkeitseibkörpers vorliegen, konnten Kowalewski et al. (2008) zeigen, dass der Funktionsverlust des Corpus luteum bei der nicht trächtigen Hündin im Sinne eines passiv degenerativen Prozesses stattfindet (Kowalewski et al., 2008b). Elektronenmikroskopische Untersuchungen lassen vermuten, dass es sich um einen Prozess des Alterns handelt (Hoffmann et al., 2004), welcher trotz erhöhter Konzentrationen von LH und Prolaktin stattfindet (Graf, 1978; Hoffmann and Schneider, 1993). Eine Beteiligung von $\text{PGF}_2\alpha$ wurde ausgeschlossen, da weder Corpus luteum noch Uterus wie bereits begründet als Produktionsstätten in Frage kommen (Kowalewski et al., 2009; Hoffmann et al., 1992).

Trotz dieser interessanten Erkenntnisse hinsichtlich der essentiellen Rolle, welche die Prostaglandine in der Regulation der Fortpflanzung beim Hund einnehmen, sind viele Aspekte zum heutigen Zeitpunkt noch unklar und bedürfen weiterer Forschungsarbeit.

Inwiefern die Expression eines spezifischen Transportmechanismus für Prostaglandine möglicherweise eine regulatorische Rolle für die Wirkung von Prostaglandinen spielt, wird im Folgenden diskutiert.

3.5.4. Prostaglandintransporter

Wie deutlich wurde, sind Prostaglandine besonders als lokale Mediatoren von enormer Wichtigkeit und übernehmen bei zahlreichen Prozessen in nahezu allen Geweben des Organismus regulatorische Aufgaben. Prostaglandine liegen bei einem physiologischen pH-Wert größtenteils als Anionen vor. Obwohl sie lipophilen Charakter haben, findet aufgrund ihrer negativen Ladung die passive Diffusion über Plasmamembranen nur zögerlich statt (Schuster,

1998). Um ihre physiologische Funktion adäquat ausüben zu können, ist die Flussrate bei passiver Diffusion zu niedrig (Lehninger, 2002). Dies weist daraufhin, dass aktive Mechanismen für den Transport von Prostaglandinen vorhanden sein müssen.

Schuster (1998) beschrieb und sequenzierte 1998 erstmals den Prostaglandintransporter (PGT), einen 12-Transmembrantransporter aus der Familie der OATP's (Organic Anion Transporting Polypeptides). PGT katalysiert mit einer hohen Affinität den Transport von PGE_2 , $\text{PGF}_2\alpha$, PGD_2 und Thromboxan B_2 . PGT vermittelt sowohl den Influx von Prostaglandinen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle als auch den Efflux neu synthetisierter Prostaglandine und beruht auf einem Antiport mit Laktat (Chan et al., 2002). PGT kommt in vielen Geweben vor (Schuster, 1998). Eine hohe Expression weist PGT insbesondere in jenen Geweben auf, welche Prostaglandine produzieren (Bao et al., 2002), darunter in vielen Epithelien z.B. von Leber, Niere und Uterus. PGT wurde 1995 in der Niere der Ratte (Schuster, 1998), 1996 in Leber, Niere und Lunge des Menschen (Lu et al., 1996) und 1999 in der Lunge der Maus nachgewiesen (Pucci et al., 1999). Dies deutet auf eine Rolle des PGT bei der metabolischen Clearance von Prostaglandinen hin. Aber auch in zahlreichen weiteren Geweben wie Gehirn, Uvea, Darm, Hoden, Ovarien und Uterus (Lu et al., 1996) wurde PGT beispielsweise beim Menschen nachgewiesen, was zeigt, dass PGT höchstwahrscheinlich auch in anderen physiologischen Prozessen regulatorische Aufgaben übernimmt.

Schon bald ergab sich die Frage, inwiefern PGT in der prostaglandinvermittelten Regulation des Reproduktionsgeschehens eine Rolle spielt. Die Expression von PGT im Uterus wurde bereits 1995 von Kanai beschrieben (Kanai et al., 1995). Wie bereits erwähnt wurde PGT auch in den Ovarien nachgewiesen. Einen Hinweis darauf, dass PGT-vermittelte selektive Transportvorgänge von Prostaglandinen im Fortpflanzungsgeschehen von Bedeutung sind, gibt die Situation beim Schwein (Bazer and Thatcher, 1977). Bei dieser Spezies gelangt endometriales $\text{PGF}_2\alpha$ entweder in die Blutbahn um am Ovar eine Luteolyse auszulösen, oder wird ins Uteruslumen abgegeben, sobald sich eine Trächtigkeit etabliert hat und eine Luteolyse nicht wünschenswert ist (Bazer and Thatcher, 1977). Dieser Sachverhalt ist ohne gerichtete Transportvorgänge nicht vorstellbar. Die Bedeutung von PGT im weiblichen Reproduktionsgeschehen wurde von verschiedenen Autoren vor allem für den Uterus und die Plazenta beschrieben. Die hohe Expression von PGT in Endometrium, Myometrium und Corpus luteum zeigt seine Bedeutung für die Modulation von para- und endokrinen prostaglandinvermittelten Vorgängen klar auf (Banu et al., 2003).

Da gerade die para- und autokrin vermittelten Effekte von Prostaglandinen bei der Regulation von Zyklus und Geburt auch beim Hund in letzter Zeit ins Zentrum des Interesses gerückt sind, ist die Rolle des kaninen PGT ein interessanter Aspekt, der der Aufklärung bedarf. Ein Beitrag zur Rolle des PGT in der Regulation der Fortpflanzung beim Hund wird in der vorliegenden Arbeit geleistet.

3.6 Die Progesteronbiosynthese und ihre Regulation

3.6.1 Progesteronbiosynthese

Die essentielle Bedeutung des Progesterons für den Erhalt der Trächtigkeit wurde bereits unter 3.3.1 dargestellt. Besonders die Expression der steroidogenen Enzyme und die Mechanismen, welche zur Bereitstellung von Substrat für die Progesteronsynthese führen, wurden bei verschiedenen Spezies untersucht. Verstärkte Aufmerksamkeit galt hierbei der Rolle des Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR). Im folgenden sollen die Progesteronbiosynthese und die Mechanismen ihrer Regulation dargestellt werden.

Progesteron leitet sich als Steroidhormon ebenso wie die weiteren Geschlechtshormone Androgene und Östrogene von Cholesterol als Vorläufermolekül ab. Ort der Synthese der steroiden Geschlechtshormone sind zum überwiegenden Teil die Gonaden.

Als Quelle des Cholesterols dienen LDL (Low density lipoproteins) oder HDL (High density lipoproteins), welche aus der Leber über die Blutbahn an den Ort der Steroidhormonsynthese, gelangen (Krisans, 1996). Die Aufnahme des Cholesterols in die Zelle geschieht durch Endozytose. Cholesterol kann unter bestimmten Bedingungen jedoch auch aus intrazellulär in den Luteinzellen gespeicherten Cholesterolestern durch die Cholesterolesterase freigesetzt werden (Cook et al., 1967).

Cholesterol wird nach seiner Aufnahme in die Zelle durch Proteine des Zytoskeletts zum Mitochondrium transportiert, wo es durch StAR von der äusseren zur inneren Mitochondrienmembran transportiert wird. Hier nun findet der erste Syntheseschritt, die Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon durch das Cytochrom P450 Side Chain Cleavage Enzyme (P450scc) statt. Pregnenolon wird aus dem Mitochondrium geschleust und von der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ $\Delta 5/\Delta 4$ Isomerase (3β HSD) im glatten endoplasmatischen Retikulum in Progesteron konvertiert. Progesteron wird durch Diffusion von der Lutealzelle freigesetzt und gelangt über das dichte Kapillarnetz des Corpus luteum ins Blut (Niswender, 2000; (Niswender et al., 2000).

3.6.2 Regulation der Progesteronbiosynthese: P450scc, 3 β HSD und StAR

Bei der Regulation der Steroidhormonbiosynthese wird eine akute Antwort von einer langfristigen Reaktion unterschieden. Während letztere die Synthese sämtlicher an der Steroidogenese beteiligten Enzyme benötigt und sich in einem langfristigen Zeitrahmen abspielt, findet die akute Antwort innerhalb weniger Minuten statt. Somit können innerhalb kürzester Zeit die aktuell benötigten Mengen an Steroiden bereitgestellt werden, um eine akute und adäquate Reaktion des Organismus zu gewährleisten (Stocco and Clark, 1996a).

Nachdem die Aktivierung des P450scc lange als limitierender Schritt in der akuten Regulation der Steroidhormonbiosynthese angesehen wurde, stellte sich schliesslich heraus, dass der beschränkende Faktor vielmehr der aktive Transport des intrazellulären Cholesterols ins Mitochondrium darstellt (Stocco and Clark, 1996a; Tuckey and Atkinson, 1989). Dieser Schritt ist limitierend, da das hydrophobe Cholesterol nur in geringem Ausmass den hydrophilen Spaltraum zwischen innerer und äusserer Mitochondrienmembran durch passive Diffusion überwinden kann. Wie bereits erwähnt ist für den Transport des Cholesterols ins Mitochondrium das StAR-Protein verantwortlich. Der Frage, welche Faktoren die Progesteronsynthese beim Hund regulieren, widmeten sich Kowalewski et al. (2006, 2008, 2009) in verschiedenen Arbeiten. Die Expression sowohl von StAR als auch von 3 β HSD im Corpus luteum zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl in trächtigen Hunden als auch nicht trächtigen Hunden wurde untersucht. Hierbei zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster für StAR und 3 β HSD. Sowohl in trächtigen als auch nicht trächtigen Tieren wurde die stärkste Expression von StAR und 3 β HSD während der Anbildung oder Blütezeit des Corpus luteum beobachtet. Im trächtigen Tier zeigte sich die höchste Expression von StAR und 3 β HSD in der Phase der Präimplantation (Tag 8-12 post ovulationem) (Kowalewski et al., 2009), im zyklischen Tier wurde die stärkste Expression für StAR an den Tagen 15 und 25 p.o. (Kowalewski and Hoffmann, 2008), für 3 β HSD an Tag 5 und 15 p.o. gezeigt (Kowalewski et al., 2006a). Sowohl bei trächtigen als auch Tieren im Diöstrus erfolgte eine signifikante Downregulation beider Faktoren in der zweiten Hälfte der Gelbkörperphase mit der niedrigsten Expression zum Zeitpunkt der Luteolyse bzw. Gelbkörperregression. Dieses Expressionsmuster spiegelt sich in den Progesteronwerten im peripheren Blut wider, eine verminderte Expression von StAR und 3 β HSD geht mit sinkenden Progesteronwerten einher (Kowalewski et al., 2009). Dies verleitet zu der Annahme, dass der Abfall der Progesteronwerte auf eine verminderte Verfügbarkeit von StAR und 3 β HSD zurückzuführen sei. Da der Transport des Cholesterols über die Mitochondrienmembran und somit die Bereitstellung des Substrates die Bedingung für weitere Syntheseschritte ist, kann jedoch angenommen werden, dass die Regulation der

Progesteronsynthese beim Hund vor allem auf Ebene des StAR-Proteins erfolgt und nicht über die Expression von 3 β HSD. Die De-novo-Proteinsynthese von StAR stellt somit einen potenten Mechanismus zur raschen Steigerung der Steroidhormonsynthese dar.

3.6.3 Funktion des Steroidogenic Acute Regulatory-Protein (StAR)

Das aktive Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) ist ein 30 kDa großes Phosphoprotein, welches an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Es wird überwiegend in Zellen mit der Kapazität zur Steroidhormonsynthese exprimiert (Stocco et al., 2005) und findet sich somit hauptsächlich in den Gonaden und der Nebenniere (Stocco, 2001). Erstbeschrieben wurde es 1991 von Stocco et al. (Stocco and Sodeman, 1991), welche gezeigt haben, dass die hormonelle Stimulation von MA-10 Leydigtumorzellen aus der Maus mit der kurzfristigen Synthese zirka 30 kDa großer, mitochondrienassoziiierter Proteine einhergeht. Da das vermehrte Auftreten dieser Proteine mit einer erhöhten steroidogenen Aktivität einherging, wurde postuliert, dass dieses „rasch synthetisierte, labile Protein“ zuständig für den Cholesteroltransport zur inneren Mitochondrienmembran sei, wo die Pregnenolonsynthese stattfindet. 1994 erfolgte die Benennung dieses neuen Proteins in Steroidogenic Acute Regulatory Protein durch Stocco et al. (1994) und es wurde nachgewiesen, dass eine verstärkte Expression von StAR auch ohne hormonelle Stimulation zu einer vermehrten Steroidhormonproduktion führt (Clark et al., 1994). Daraus wurde geschlossen, dass dieses Protein in der akuten Regulation der Steroidogenese eine Schlüsselrolle spielt. Die kritische Rolle, welche StAR in der Steroidhormonsynthese zukommt, wurde in Experimenten mit StAR-Knockoutmäusen bestätigt, welche ohne die Substitution von Mineral- und Glukokortikoiden nicht lebensfähig waren und starke Abweichungen in der Entwicklung der Gonaden aufwiesen (Caron et al., 1997b). Der Phänotyp dieser Mäuse entsprach dem beim Menschen vorkommenden Krankheitsbild des Adrenogenitalen Syndroms (engl. Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia, lipoid CAH), bei welchem gravierende Defizite in der Steroidhormonbiosynthese auftreten (Stocco, 2001), welche nicht mit Lebensfähigkeit vereinbar sind. Bisher gelten Mutationen im StAR-Gen als einzige bekannte Ursache für diese autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit (Miller, 1997).

3.6.4 Regulation der Expression und Funktion von StAR

Die Expression von StAR wird sowohl positiv als auch negativ reguliert. Eine Expressionssteigerung von StAR geht dabei meist mit einer erhöhten Steroidhormonbiosynthese einher, wobei anzumerken ist, dass zirka 10% der

Steroidhormonproduktion über StAR-unabhängige Mechanismen erfolgen (Lin et al., 1995). Steroidogene Substanzen sind wie bereits beschrieben PGE_2 , aber auch zahlreiche weitere wie unter anderem LH, hCG (humanes Choriongonadotropin), PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin), ACTH (Adrenocorticotropes Hormon), FSH, cAMP-Analoga und Insulin. Eine reduzierte StAR-Expression findet unter weiterem durch folgende Substanzen oder Umstände statt: $\text{PGF}_2\alpha$, Interferon γ , $\text{TNF}\alpha$, bzw. Alterung, Hitzeschock, Sepsis und diverse Pestizide (Übersicht bei (Stocco, 2001)).

Die Signale können entweder über membranständige Rezeptoren vermittelt werden, oder aber direkt auf das StAR-Gen einwirken, was auf zahlreiche regulatorische Elemente der StAR-Expression hinweist.

3.6.4.1 Charakterisierung des StAR-Promotors und seiner Transkriptionsfaktoren

Die StAR-Promotorregion ist ein Abschnitt in der 5'-Flanking-Region des StAR-Gens, welcher wichtige Elemente zur Steuerung der StAR-Expression enthält. Obwohl der gesamte Promotor insgesamt 3,6 kb umfasst, wurde in verschiedenen 5'-Deletionsversuchen und gerichteten Mutageneseversuchen am murinen StAR-Promotor eine Region zwischen -254 und -113 bp identifiziert, welche essentiell für eine vollständige Promotoraktivität ist (Caron et al., 1997a). Weitere Studien bei verschiedenen Spezies zeigten die Bedeutung der ersten -151 bp vom Transkriptionsstart (Manna et al., 2003). Diese Region -151/-1 enthält zahlreiche Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren und besitzt eine cAMP-induzierte Promotoraktivität, welche der des gesamten Promotors gleichkommt (Wooton-Kee and Clark, 2000; Manna et al., 2002b; Manna et al., 2002a) (Abb. 3.6.4.1). Die Mechanismen der Transkriptionsregulation, nicht aber Bedeutung der proximalen Region des StAR-Promotors scheint sich bei den untersuchten Spezies (Ratte, Mensch) zu unterscheiden (Sandhoff et al., 1998; Sugawara et al., 1996). Die Vermutung einer vergleichbaren Bedeutung wird dadurch unterstützt, dass die Region zwischen -138 und -1 bei den verschiedenen Spezies eine hohe Sequenzhomologie bei Ratte, Mensch, Schaf und Schwein aufweist und somit konserviert ist (Manna et al., 2003; Reinhart et al., 1999). Diese Konservierung ist die Grundlage für einen Sequenzvergleich zwischen Maus und Hund und erlaubt uns die Festlegung von „Predicted-binding-sites“ für verschiedene Transkriptionsfaktoren, welche beim Hund die StAR-Expression regulieren. Es wurde eine große Anzahl positiver und negativer Faktoren beschrieben, welche mit der StAR-Promotorregion interagieren und als Enhancer oder Silencer der Genexpression wirken. Im Folgenden sollen einige der verschiedenen Transkriptionsfaktoren erläutert werden.

Wie bereits beschrieben ist die Expression von StAR zu einem überwiegenden Teil cAMP-vermittelt. Die Stimulation mit trophischen Hormonen führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase, welche zur Synthese von cAMP aus ATP führt. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche über die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren zur Expression des Zielgens führt. Die Regulation der Transkription über den Adenylatzyklaseweg ist ein weit verbreiteter fundamentaler biologischer Prozess, welcher seine Wirkung klassischerweise über die Interaktion mit dem cAMP-responsive Element Binding Protein (CREB) ausübt. CREB interagiert mit dem cAMP-response Element (CRE) in der Promotorregion von cAMP-responsiven Genen. Interessanterweise ist ein vollständiges CRE-Motiv in der murinen StAR-Promotorregion nicht vorhanden (Stocco, 2001). Allerdings wurden drei sogenannte „5'-CRE half-sites“ in der cAMP-responsiven StAR-Promotorregion der Maus identifiziert, deren Funktionalität und Interaktion mit CREB nachgewiesen wurde (Manna et al., 2002a).

Ein Transkriptionsfaktor aus der Gruppe der Orphan Nuclear Receptor Transcriptionfactors, welcher eine wichtige Rolle in der Regulation des StAR-Gens zu spielen scheint, ist der Steroidogenic Factor 1 (SF-1). SF-1-Knockout-Mäuse werden ohne Nebenniere und Gonaden geboren, was auf die wichtige Rolle des SF-1 in der Entwicklung dieser Organe hinweist (Sadovsky et al., 1995). Bei verschiedenen Spezies wurden mehrere SF-1-binding sites in der StAR-Promotorregion lokalisiert und Transfektionassays zeigten die Fähigkeit von SF-1 zur Aktivierung der Transkription des StAR-Gens (Manna et al., 2003). Zwei SF-1 Bindungsstellen in der murinen proximalen Promotorregion (-102/-95 und -46/-39) weisen eine hohe Konservierung bei verschiedenen Spezies auf (Reinhart et al., 1999). Trotz seiner Bedeutung bei der Regulation der StAR-Promotoraktivität zeigten Mutationsversuche, dass SF-1 nicht als alleiniger Faktor für die cAMP-abhängige Regulation der StAR-Gentranskription verantwortlich ist (Manna et al., 2002a; Wootton-Kee and Clark, 2000).

Fos und Jun sind zwei Mitglieder der Activator Protein 1 (AP-1) Familie. Sie üben ihre Funktion über Bindung an eine DNA-Sequenz aus, welche AP-1/TRE Element genannt wird (Manna et al., 2003). Mutationen in diesem AP-1 Element führten zu einer um 50% verringerten Aktivität des murinen StAR-Promotors, was die Bedeutung von Fos und Jun bei der positiven Regulation der Transkription von StAR zeigt. Spezifische Antikörper deuteten auf die vorrangige Bedeutung der Familienmitglieder c-Fos and Fra-2 hin. Experimente mit Knockoutmäusen zeigten die Bedeutung von c-Jun, da die fehlende Expression dieses Proteins mit embryonaler Letalität einherging (Hilberg et al., 1993). Interessanterweise führte die Mutation in weiteren cis-Elementen des StAR-Promotors zusätzlich zur Abweichung im AP-1

Element zu einer vergleichsweise stärkeren Aktivitätsverringern (Manna et al., 2004). Fos und Jun werden durch die Aktivierung des PKA oder des PKC-Signaltransduktionsweges phosphoryliert, was ihre Kapazität, mit anderen Transkriptionsfaktoren zu interagieren, erhöht (Hunter and Karin, 1992). Interaktionen finden beispielsweise zwischen c-Fos bzw. c-Jun und SF-1, GATA-4 und CEBP/β statt (Manna et al., 2004).

Die CCAAT/enhancer-binding Proteins (C/EBPs) sind eine Familie von Leucinezippertranskriptionsfaktoren. Die proximale StAR-Promotorregion enthält bei Maus und Mensch zwei Bindungsstellen für diese Proteine (Silverman et al., 1999). Zwei verschiedene Mitglieder der C/EBP-Familie (C/EBPα und C/EBPβ) wurden in Leydigzellen und Granulosazellen des Ovars nachgewiesen (Nalbant et al., 1998; Piontkewitz et al., 1996). Auch für diesen Transkriptionsfaktor zeigten Mutationsexperimente eine reduzierte StAR-Promotoraktivität (Reinhart et al., 1999; Silverman et al., 1999). Somit scheinen auch mit den C/EBPs wichtige Faktoren in der Transkription von StAR vorzuliegen.

Ähnliche Ergebnisse ergaben Mutationsversuche für die Faktoren GATA, SREBP und SP-1. All diese und weitere scheinen an der Regulation der Expression von StAR beteiligt zu sein.

Neben Faktoren, welche die Transkription positiv beeinflussen, wurden auch Elemente identifiziert, welche zur Repression des STAR-Gens führen. Es wurden Yin Yang 1 (YY-1) und DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X-chromosome) beschrieben, wobei letzterem eine bedeutendere Rolle zukommt.

Bei einer Überexpression von DAX-1 wird die Expression des StAR-Gens und damit auch die Steroidhormonbiosynthese gehemmt (Lalli et al., 1998). Interessanterweise inhibiert DAX-1 ebenfalls die Expression weitere Enzyme der Steroidogenese, wie P450_{scc}, 3βHSD und die Aromatase (Manna et al., 2003). Somit konnte klar gezeigt werden, dass DAX-1 einen wichtigen negativen Transkriptionsfaktor darstellt. DAX-1 nimmt durch seine Wirkung eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Funktion der steroidhormonproduzierenden Gewebe ein. Mutationen im DAX-1-Gen führen zu starken Beeinträchtigungen der Nebennieren- und Gonadenfunktion (Muscatelli et al., 1994). Eine Duplikation der Region auf dem X-Chromosom, welche das DAX-1-Gen beherbergt, führt zur Geschlechtsumkehrung von männlich zu weiblich, was auf die Bedeutung dieses Faktors bei der Differenzierung der Geschlechtsorgane hinweist (Bardoni et al., 1994). YY-1 ist ein multifaktorieller Transkriptionsfaktor, der auf verschiedene Weise wirken kann. YY-1 wirkt entweder als Initiator, Aktivator oder Repressor der Transkription von Genen (Shi et al., 1997). Es wurde nachgewiesen, dass YY-1 auf das StAR-Gen als hemmender Transkriptionsfaktor wirkt (Liu et

al., 2007). Im StAR-Promotor der Ratte wurden drei Stellen identifiziert, an welche YY-1 mit hoher Affinität direkt bindet. Interessanterweise konnte eine Deletion dieser Stellen durch Mutation die inhibierende Wirkung von YY-1 nicht unterbinden, was auf das Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren oder Kofaktoren hinweist (Nackley et al., 2002). So wurde beispielsweise festgestellt, dass YY-1 die SREBP-vermittelte Transkriptionsinduktion von StAR durch Bindung an eine SREBP/YY-1-Bindungsstelle im StAR-Promotor der Ratte hemmt (Nackley et al., 2002).

Abb. 3.6.4.1: Schematische Darstellung des StAR-Promotors (-151/-1 bp). Gezeigt werden die Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, die die Transkription des StAR-Gens kontrollieren. (Manna et al., 2003)

Aus dieser Übersicht wird deutlich, dass das feinabgestimmte Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren die cAMP-Responsivität des StAR-Promotors bedingt. Grundlage ist stets die PKA-vermittelte Induktion der StAR-Gen-Expression durch die einzelnen Transkriptionsfaktoren (Manna et al., 2003; Stocco and Clark, 1996b).

PKA reguliert aber nicht nur die Expression von StAR, sondern ist auch posttranslational verantwortlich für die Überführung von StAR in seine biologisch aktive, phosphorylierte Form (Miller, 2007; Stocco and Clark, 1996a). Arakane et al. (1997) konnten zwei Phosphorylierungssequenzen auf dem StAR-Protein identifizieren, welche in verschiedenen Spezies hochkonserviert sind (Arakane et al., 1997). Während Mutationen in Serin 57 ohne Effekt auf die Steroidogenese blieben, resultierte die Mutation in Serin 194/195 zu einer um die Hälfte verringerten Synthese von Pregnenolon (Arakane et al., 1997) und stellt eine von zahlreichen Punktmutationen dar, welche zur Entstehung des Krankheitsbildes der bereits beschriebenen CAH führt (Katsumara, 2000). Während die PKA I, eine der beiden PKA-Unterfamilien, vor allem für die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren zuständig ist, erscheint die PKA II für die posttranslationale Phosphorylierung von StAR zuständig zu sein (Dyson et al., 2009).

Ob auch die Proteinkinase C (PKC) an der Regulation der Steroidogenese beteiligt ist, haben Jo et al. (2005) untersucht. Sie konnten in Ma-10 Leydig Tumorzellen zeigen, dass eine Hemmung der PKC zu einer verminderten Steroidhormonproduktion und einer verringerten Transkription von StAR führt. Im Gegenzug führte eine experimentelle Aktivierung der PKC zwar zu einer verstärkten StAR-Expression und einer vermehrten Phosphorylierung von CREB, nicht jedoch zu einer gesteigerten Steroidogenese, da PKC nicht die Fähigkeit hat, StAR posttranslational zu phosphorylieren (Jo et al., 2005). Eine geringfügige Steigerung der Aktivität der PKA war jedoch bereits fähig, die Steroidogenese effektiv zu steigern (Jo et al., 2005).

4 Material und Methoden

4.1 Probenmaterial

Sämtliche unter 4.1.1 bis 4.1.3 beschriebenen Proben standen vorbereitet zur Verfügung und wurden mir freundlicherweise von M.P. Kowalewski zur Durchführung der Versuche überlassen.

Alle an Hunden durchgeführten Versuche wurden von den entsprechenden Stellen genehmigt [Versuchsgenehmigung Nr. II 25.3-19c20-15c GI 18/14 und VG3-19c20/15c GI 18,14 (Justus-Liebig-Universität Giessen)] sowie Versuchsgenehmigung [Ankara 2006/06 (Tiermedizinische Fakultät der Universität Ankara)].

Der Zeitpunkt der Ovulation wurde ab Beginn der Läufigkeit durch die Messung des Plasmaprogesteronspiegels alle 1-2 Tage bestimmt. Der Ovulationszeitpunkt wurde bei einem Wert des Plasmaprogestérons > 5 ng/ml angenommen.

Die Gewinnung des Gewebes erfolgte mittels Ovariohysterektomie.

Die CI wurden unmittelbar nach der Entnahme vom umgebenden Bindegewebe getrennt. Für die RNA-Konservierung wurde ein Teil der Proben über Nacht bei 4°C in RNAlater® (Ambion Biotechnologie GmbH, Wiesbaden, DE) fixiert und bei -80°C bis zur RNA-Isolierung bzw. Proteinisolierung aufbewahrt. Die Proben für die Immunhistochemie (IHC) wurden in 4% gepuffertem (pH 7.0) Formaldehyd für 24 Stunden fixiert. Anschliessend wurde das Gewebe mit Phosphatpuffer (Zusammensetzung siehe 8.1 Puffer und Lösungen) mehrmals gespült. Danach wurde das Gewebe über jeweils 24 Stunden in 30-, 50- und 70% Alkohol dehydriert und in Paraffin eingebettet.

4.1.1 Nicht trächtige Tiere

An den Tagen 5, 15, 25, 35, 45 und 65 post ovulationem wurden jeweils fünf klinisch gesunde geschlechtsreife Hündinnen verschiedener Rassen ovariohysterektomiert. Die Corpora lutea wurden wie oben beschrieben gesammelt und behandelt.

4.1.2 Trächtige Tiere

Aus jeweils 3-5 klinisch gesunden, trächtigen Hündinnen im Alter von 3 – 5 Jahren wurden 4 Versuchsgruppen gebildet:

Gruppe 1: Präimplantation, Tag 8 – 12 (n=5)

Gruppe 2: Postimplantation, Tag 18 – 25 (n=5)

Gruppe 3: mittlere Trächtigkeit, Tag 35 – 45 (n=5)

Gruppe 4: präpartale Luteolyse (n=3)

In Gruppe 4 wurde ab Tag 58 post ovulationem alle 6 Stunden der Plasmaprogesteronspiegel bestimmt. Sobald in zwei aufeinanderfolgende Messungen der P4-Wert auf unter 2-3 ng/ml abgefallen war, wurde die Ovariohysterektomie durchgeführt (Kowalewski et al., 2009). Corpora lutea und Proben der uteoplazentären Einheit wurden entnommen und wie oben beschrieben konserviert.

4.1.3 Induzierter Abort

10 trächtige Hündinnen wurden, wie bei Kowalewski et al. beschrieben, mit dem Progesteronrezeptorblocker Aglepriston während der mittleren Trächtigkeit (Tag 40 – 45 post ovulationem) behandelt (Kowalewski et al., 2010). Die Dosierung betrug, wie zur Abortinduktion empfohlen, 10 mg/kg Körpergewicht. Die Gabe erfolgte zweimal im Abstand von 24 Stunden. Anschliessend wurde die Ovariohysterektomie 24 (n = 5) oder 72 Stunden (n = 5) nach der zweiten Injektion vorgenommen. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie bereits beschrieben.

4.1.4 Gewinnung kaniner Luteinzellen

Zur Gewinnung der Luteinzellen wurde Gewebe von Tieren (n=15) verwendet, welche aus klinischen Gründen in der Abteilung für Kleintierreproduktion, Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Departement für Nutztiere, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich ovariohysterektomiert wurden. Die Ovariohysterektomie erfolgte 7-14 Tage nach Abklingen der äusserlichen Läufigkeitsanzeichen. Unmittelbar post operationem wurden die Luteinzellen isoliert und kultiviert. Die Behandlung des Gewebes wird im folgenden beschrieben.

4.2 Primäre Luteinzellkultur

4.2.1 Isolation und Kultivierung von Luteinzellen aus dem Corpus luteum

Das isolierte Ovar wurde in 37 °C warmem PBS, versetzt mit 1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), gewaschen und die Corpora lutea wurden mit dem Skalpell auf einer sterilen Unterfläche (Petrischale, Sterilin Limited, Newport, UK) abgetrennt und halbiert. Das Gelbkörpergewebe wurde aus der bindegewebigen Kapsel herausgeschabt, mit dem Skalpell zerkleinert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (TPP®, Trasadingen, CH) mit 20 ml 37°C warmem PBS + 0,03 g gelöster Kollagenase (Collagenase

NB8 Broad Range from Clostridium hämolyticum 1G, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingebracht. Das Gewebe wurde nun für 2-3 Stunden unter permanentem Schütteln bei 37 °C verdaut und anschliessend homogenisiert. Hierfür wurde die Suspension durch ein Zellsieb (Cell strainer 70 µM, BD Falcon, Biosciences Discovery Labware, Belford, USA) gegossen und zurückbleibende Gewebereste wurden durch vorsichtiges Reiben mit einem Stössel zerkleinert.

Nach anschliessender Zentrifugation bei bis zu 600 g für 10 Minuten (GS-15R Centrifuge, Beckmann), wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 20 ml warmem Kulturmedium (DMEM/Ham's F12 mit 10% Fetales Kälberserum, 2mM Glutamin, 1% ITS und 1% Penicillin/Streptomycin, Zusammensetzung siehe Tabelle 4.2.1) resuspendiert. Dieser Schritt wurde 2 Mal wiederholt, um Gewebereste und Zellkontaminationen, etwa durch Erythrozyten, zu reduzieren. Schliesslich wurden die isolierten Zellen in Kulturmedium in 6- oder 12-well-plates (TPP®, Zellkulturplatte 6 oder 12, Trasadingen, CH) ausgesät und nach 24 Stunden mit warmem PBS gewaschen, um totes Zellmaterial zu entfernen. Pro Kulturschälchen wurden $1,5 - 2 \times 10^5$ Zellen (12-well-plate), respektive $3 - 4 \times 10^5$ Zellen (6-well-plate) ausgesät.

Die Zellkulturen wurden im Inkubationsschrank (Forma Steri-Cycle CO₂ Incubator, Model 371, Thermofisher Scientific, Marietta, USA) bei 37 °C (CO₂ 5,0%, Feuchtigkeit 95%) kultiviert und nach Bedarf mit warmem Kulturmedium gefüttert. Bei einer Konfluenz von zirka 80% wurden die Versuche dieser Studie durchgeführt, eine Passagierung fand vor Durchführung der Experimente nicht statt.

Tabelle 4.2.1: Verwendetes Kulturmedium

Komponenten:	Ansatz (in ml)
DMEM/Ham's F12*	435
Penicillin/Streptomycin 100x*	5
ITS Supplement * (Insulin, Transferrin, Selenium)	5
Glutamin 200 mM*	5
FCS (Fetal Bovine Serum Gold)*	50

* sämtliche Bestandteile des Kulturmediums stammen von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich.

In Vorversuchen wurde der zeitliche Verlauf der StAR-Expression, der Promotoraktivität und die resultierende steroidogene Aktivität der Lutealzellen betrachtet, hierbei wurden die höchste

Expression von StAR und die höchste Progesteronproduktion 6 Stunden nach der Stimulation festgestellt. Dieser Zeitpunkt wurde somit für die Durchführung sämtlicher Stimulationsexperimente gewählt.

Alle Versuche mit Zellkulturen wurden voneinander unabhängig zu mindestens drei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, wobei jeweils Material aus unterschiedlichen Hündinnen verwendet wurde.

4.2.2 Immunfluoreszenzfärbung der primären kaninen Luteinzellen

Um die steroidogene Identität der isolierten Zellen zu bestätigen, erfolgte eine Markierung der Proteine 3 β HSD (3 β Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Δ -5/ Δ -4Isomerase) und StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) mit einem spezifischen Immunserum als Primärantikörper und einem immunfluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper.

Für die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung wurden isolierte Luteinzellen in 6-Well-Plates ausgesät, wobei in jedes Well ein Deckglässchen (24x24mm Mikroskopisches Deckglässchen, E. Gribi AG Bern, CH) gelegt wurde. Somit haften die Zellen anstatt auf dem Boden des Wells auf den Deckglässchen und können nach der Entnahmen des Deckglässchens auf diesem angefärbt werden. 48 Stunden nach der Aussaat wurde das Kulturmedium entfernt. Das weitere Vorgehen fand laut Protokoll (Tabelle 4.2.2b) statt.

Tabelle 4.2.2a: Liste der verwendeten Antikörper

Primärantikörper (spezifisches Immunserum):	Verdünnung:	Sekundärantikörper:	Verdünnung:
StAR ¹	1:3000	Fluoreszenzmarkierter Antikörper IgG aus der Ziege gegen das Kaninchen ³	1:200
3 β HSD ²	1:3000	Fluoreszenzmarkierter IgG Antikörper aus der Ziege gegen das Kaninchen ³	1:200

1) StAR-Antikörper: polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen anti human. Der StAR-Antikörper wurde freundlicherweise von Prof Dr. D. M. Stocco, Texas Tech University Health Sciences Center, USA, zur Verfügung gestellt (Clark et al., 1994).

2) Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen humanes 3 β HSD der Plazenta (Lorence et al., 1990), eine großzügige Spende von Prof. J. I. Mason, University of Edinburgh, Scotland

3) Alexa Fluor®594 Goat antirabbit IgG, Invitrogen, Zug, CH

Tabelle 4.2.2b: Arbeitsprotokoll Immunfluoreszenzfärbung

Arbeitsschritt:		Bemerkung:
Waschen mit PBS		
2% Formaldehyd	10 min 37 °C	Fixierung
Waschen mit PBST (PBS mit 0,25% Triton X)	5 min RT	
50mM Glycin ¹ in PBS (75 mg/50 ml PBS)	5 min RT	Demaskierung der Epitope
Waschen mit PBST	2 x 5 min RT	
Inkubation mit Blockierungsserum: PBST und Normal Goat Serum 10% ² (richtet sich nach dem Sekundärantikörper)	30 min RT	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
Aufragen des Primärantikörpers	2 h, RT	Spezifische Bindung des Primärantikörpers an das Zielprotein
Waschen mit PBST	3 x 10 min	
Aufragen des Sekundärantikörpers (Verdünnung 1:200) und DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole. 1:1000) in PBST	1 h RT	Immunfluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper bindet an adhäsierten Primärantikörper, DAPI zur Darstellung des Zellkerns
Waschen mit PBST	3 x 10 min RT	
Inkubation mit 2% Formaldehyd	10 min RT	Nachfixierung
Waschen mit H ₂ O bidest.	1 x kurz RT	
Eindecken mit Glycergel ³		

RT=Raumtemperatur

1) Sigma-Aldrich, Chemi GmbH, Deisendorf, Deutschland

2) KPL, Gaitherburg, USA

3) Dako glycergel mounting medium, Dako, Baar, CH

4.3 PCR und RealTime(TaqMan)PCR

4.3.1 RNA-Isolierung

4.3.1.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Die mit RNAlater® behandelten Gewebestücke wurden nach der Lagerung bei -80 °C in gefrorenem Zustand in Alufolie mit einem Hammer zerkleinert. Die Gewebesplitter wurde

unter Zusatz von Flüssigstickstoff in einem gekühlten Mörser mit einem Pistill pulverisiert. Das entstandene Gewebepulver wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Trizol® (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und mittels eines Ultraturrax homogenisiert (Homogenisator VDI 12, VWR, Dietikon, CH). Die weiteren Arbeitsschritte orientieren sich am Protokoll des Herstellers des Trizol®-Reagenz. Sämtliche Schritte erfolgten auf Eis bzw. in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge.

Tabelle 4.3.1.1: Arbeitsprotokoll RNA-Isolierung

Arbeitsschritt:	Bemerkung:
10 min auf Eis	
Zusatz von 200 µl Chloroform, vorsichtig schütteln	Entstehung von drei Phasen:
5 min auf Eis	-oberste wässrige Schicht mit RNA
20 min zentrifugieren, 13 800 – 18 700 g	-weißliche mittlere Schicht mit DNA
	-rosafarbene untere Schicht mit Proteinen
Abpipettieren der obersten Schicht in ein neues Reaktionsgefäß	Rest verwerfen
Wiederholung der Aufreinigung mit Chloroform	
Mit der gleichen Menge Isopropanol versetzen, aufschütteln	Fällung der Nukleinsäuren
30 min bei -20 °C kalt stellen	
Aufschütteln und 10 min zentrifugieren 13 800 – 18 700 g	
Überstand verwerfen	
500 µl 70% Ethanol zugeben	
10 min zentrifugieren 13 800 – 18 700 g	
Letzte drei Arbeitsschritte wiederholen	
Überstand verwerfen und Pellet bei Raumtemperatur trocknen lassen	RNA-Pellet erscheint weiss
Pellet in 50 µl sterilem bidest. Wasser resuspendieren	
Inkubation 10 min bei 50 °C im Thermomixer	
Zufügen von 1µl RNase-Inhibitor ¹	Schützt vor RNA-Abbau
Photometrische Dichtebestimmung	

1) Riboloc RNase Inhibitor, 40 U/µl, Fermentas, Le-Mont-sur-Lausanne, CH

4.3.1.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Zum Ernten der Zellen wurde das Nährmedium entfernt und es wurde mit kaltem PBS (4° C) gespült. Anschliessend wurde jedes Kulturschälchen mit 500 µl Trizol® versetzt und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäss überführt. Der Ansatz wurde mit dem Vortex (Vortexer Genie 2TM, ABS, Dietikon, CH) geschüttelt.

Anschliessend erfolgte der Zusatz von Chloroform.

Das weitere Protokoll entspricht demjenigen für die RNA-Isolierung aus Gewebe, wobei jedoch stets die halbe Menge der Reagenzien zum Einsatz kommt und die Resuspension der RNA in nur 20 µl sterilem bidest. Wasser erfolgt.

Die photometrische Dichtebestimmung erfolgte mittels eines UV-Spektrometers (SmartSpec™ Plus, BioRad, Reinach, CH) in trUView Cuvettes (BioRd, Reinach, CH) bei 260 nm.

Anhand der ermittelten Konzentration wurden durch Zusatz von sterilem Aqua bidest. Arbeitslösungen mit 100 ng RNA/µl erstellt. Unverdünnte Stamm- und eingestellte Arbeitslösungen wurden bei -80 °C gelagert.

4.3.2 DNase-Behandlung

Mittels der DNase Behandlung wird eventuell in der Probe enthaltene genomische DNA degradiert, um eine fälschliche Amplifikation dieser DNA und somit ein falschpositives Ergebnis zu verhindern. Die DNase-Behandlung erfolgte mit RQ1 DNase RNase-Free von Promega (Promega, Madison, USA). 3,25 µl Dnase-Mix (Zusammensetzung siehe Tabelle 4.3.2) wurden mit 6,65 µl RNA-Arbeitslösung (RNA 100ng/µl) auf Eis versetzt und im Thermocycler (Mastercycler, Vaudaux-Eppendorf AG, Basel, Ch) inkubiert. Nach 30 Minuten bei 37 °C wurden je Probe 1 µl DNase-Stopp-Solution (EDTA) zur Beendigung der enzymatischen Aktivität der DNase zugegeben und die Reaktion bei 65 °C über 10 Minuten inkubiert.

Aufgrund einer geringen Stabilität der RNA nach der DNase-Behandlung wurde die reverse Transkription unmittelbar im Anschluss durchgeführt.

Tabelle 4.3.2: Ansatz für DNase-Mix

Komponenten:	Einfacher Ansatz (in µl):
DNase-Puffer 10x *	1
DNase RNase-free 10 U/µl*	1
Steriles bidest. Wasser	1,25
Gesamt:	3,25

*Promega, Madison, USA

4.3.3 Reverse Transkription (RT)

Durch die Reverse Transkription kann aus isolierter Gesamt-RNA cDNA synthetisiert werden. Zur Synthese von cDNA wurde das GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kit von Applied Biosystems (Rotkreuz, CH) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Als Startprimer dienten bei der RT unspezifisch bindende Random Hexamers.

Tabelle 4.3.3: Ansatz für die Durchführung der RT

Komponenten:	Einfacher Ansatz (in µl):
Steriles bidest. Wasser	1
RT-Buffer 10 x*	2
MgCl ₂ 25 mM*	2
dNTP (Desoxyribonucleotidtriphosphatmix) 10 nM*	2
Random Hexamers 50 µM*	0,5
RNAse Inhibitor 20 U/µl*	0,5
Reverse Transkriptase 50 U/µl*	0,5
Gesamt:	8,5

*sämtliche Reagenzien von Applied Biosystems (Rotkreuz, CH)

Pro Ansatz wurden 1,5 µl der DNase-behandelten RNA-Lösung eingesetzt.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (Mastercycler, Vaudaux-Eppendorf AG, Basel, CH) nach aufgeführtem Programm:

Phase		Bedingungen
-------	--	-------------

1	8 min	21 °C
2	15 min	42 °C
3	5 min	99 °C
4	hold	4 °C

Die weitere Aufbewahrung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

4.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Primerpaare wurden mit der Primer Express Software (Version2.0, Applied Biosystems, Foster City, USA) ermittelt und bei der Firma Microsynth (Balgach, CH) geordert.

10µl cDNA-Lösung wurden mit 39 µl Prämix und 1 µl Primermix, bestehend aus dem Sense- und dem Antisense-Primer zu gleichen Teilen, gemischt. Im Primermix liegen die Primer jeweils in einer Verdünnung von 10 pmol/µl vor.

Der Prämix setzt sich wie in Tabelle 4.3.4a aufgeführt zusammen.

Tabelle 4.3.4a: Zusammensetzung des Prämix für die PCR

Komponenten:	Einfacher Ansatz (in µl):
MgCL ₂ 25 mM	2
PCR-Puffer 10 x	4
Steriles bidest. Wasser	32,75
GOLD-AmpliTaq Polymerase	0,25
Gesamt:	39

Die PCR fand unter folgenden Bedingungen im Thermocycler (Mastercycler, Vaudaux-Eppendorf AG, Basel, CH) statt:

Tabelle 4.3.4b: Reaktionsbedingungen für die PCR

Schritt:	Temperatur:	Dauer:
Initiale Denaturierung und Aktivierung der Gold AmpliTaq-Polymerase	95 °C	10 min
Beginn der Zyklen:		
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	primerspezifisch	1 min
Elongation	72 °C	1,5 min
Wiederholung der Zyklen: 35 - 40 x		
Letzte Verlängerung	72 °C	10 min
Lagerung bis zur Entnahme	4 °C	x

Bei jeder Reaktion wurde ein sogenanntes Housekeeping-Gen mitdetektiert, welches die Qualität der verwendeten mRNA bzw. cDNA und eine adäquate Amplifikation durch die PCR anzeigt. In unseren Versuchen war das Housekeeping-Gen GAPDH (1,3-Diphosphoglycerat). Die Analyse der Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Zur Herstellung des 2%-Gels wurden 1,2 mg Agarose mit 60 ml TBE-Puffer aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Die heisse Agaroselösung wurde mit 6 µl Ethidiumbromid (Ethidiumbromid 1%, Roth GmbH & Co, Arlesheim, CH) vermischt und in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gefüllt. Ethidiumbromid bindet an die DNA und macht sie somit im UV-Licht sichtbar. Ein eingefügter Kamm führte zur Bildung der Taschen, in welche nach dem Verfestigen des Gels das PCR Produkt geladen wurde. Vor dem Beladen wurden 15 µl des PCR-Produkts mit 1 – 1,5 µl Loading Dye (DNA Loading Dye 6%, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) gemischt. Nach Einsetzen des Gels in eine TBE-gefüllte Elektrophoresekammer (Owl easy castTM B1A, Thermo Scientific, Reinach, CH) fand die Auftrennung der DNA bei 125 V über zirka 30-40 Minuten statt (Power PacTM, BioRad, Reinach, CH). Die Darstellung der separierten PCR-Produkte als Banden erfolgte im UV-Licht mit dem UV-Transluminator (Molecular Imager Chemie DocTM XRS+ mit der Image LabTM Software).

4.3.5 Semi-quantitative RealTime(TaqMan)PCR

4.3.5.1 Grundlagen

Mit der semi-quantitativen RealTime(TaqMan)PCR als Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR ist eine Quantifizierung der mRNA möglich, da das Expressionsniveau eines bestimmten Gens, des Targetgens, bestimmt wird. Ebenso wie bei der PCR erfolgt eine Vervielfältigung der DNA durch spezifische Primer, zusätzlich werden entweder interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, welche sich an die DNA anlagern oder molekulare Sonden eingesetzt. In beiden Fällen entsteht ein Fluoreszenzsignal, welches proportional zur Menge der amplifizierten DNA zunimmt. Eine Sonde ist die TaqMan-Sonde. Diese Sonde ist an einem Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM) markiert, am anderen Ende befindet sich ein sogenannter Quencher (TAMRA), der das Lichtsignal löscht. Bei intakter Sonde wird somit kein Lichtsignal detektiert.

Die TaqMan-Sonde bindet an den komplementären DNA-Strang. Trifft nun die Taq-Polymerase während der Polymerisierung auf die gebundene Sonde, so baut sie aufgrund einer ihr innewohnenden 5'- 3'Exonukleaseaktivität die Sonde ab. Fluorophor und Quencher entfernen sich nun von einander, weswegen das Fluoreszenzsignal sichtbar wird, welches am Ende jedes Zyklus gemessen wird.

Ein Signal entsteht nur bei vorhandener Ziel-RNA (oder cDNA) und der Verwendung passender Primer.

4.3.5.2 Durchführung der RealTime(TaqMan)PCR

Die RealTime(TaqMan)PCR wurde mit dem FastStart Universal Probe Master Mastermix durchgeführt (Roche, Basel, CH).

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes gestaltet sich wie in Tabelle 4.3.5.2a beschrieben. In eine 96-well optical plate (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH) wurden pro well 20 µl Reaktionsansatz vorgelegt und 5 µl cDNA aus der Reversen Transkription zugefügt. Die Messung erfolgte für jede Probe im Doppelansatz. Für jeden Primer wurde eine non-template-control gemessen, in der statt cDNA steriles bidest. Wasser enthalten war, um etwaige Hintergrundsignale und mögliche cDNA-Kontaminationen zu detektieren. Als Referenzgene dienten GAPDH und 18SrRNA. Eine sogenannte RT-Minus-Kontrolle zur Kontrolle der erfolgreichen DNase-Behandlung wurde durchgeführt.

Tabelle 4.3.5.2a: Reaktionsansatz für die RealTime(TaqMan)PCR

Komponenten:	Einfacher Ansatz (in µl):
MasterMix 2 x	12,5
Sense-Primer 5 µM	1,5
Antisense-Primer 5 µM	1,5
TaqMan-Sonde 5 µM	1,0
Steriles bidest. Wasser	3,5
Gesamt:	20

Die Realtime-PCR wurde im 7500 Fast Realtime PCR System (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 4.3.5.2b: Reaktionsbedingungen der RealTime(TaqMan)PCR

Phase:	Dauer:	Temperatur:
1. Initiale Denaturierung	10 min	95 °C
2. Denaturierung	15 sek	95 °C
3. Annealing und Verlängerung	1 min	60 °C
Schritt 2. und 3. werden 39 x wiederholt		

Tabelle 4.3.5.2c: Liste aller verwendeten Primer

Primer	Genbank Accession- Nr.	Basensequenz	Produk- t-länge
GAPDH-for	AB028142 (Kowalewski et al., 2006b)	5`-GCT GCC AAA TAT GAC GAC ATC A-3`	75bp
GAPDH-rev		5`-GTA GCC CAG GAT GCC TTT GAG-3`	
GAPDH TaqMan- Sonde		5`-TCC CTC CGA TGC CTG CTT CAC TAC CTT-3`	
18SrRNA- for	FJ797658 (Kowalewski et al., 2011)	5`-GTC GCT CGC TCC TCT CCT ACT-3`	125 bp
18SrRNA- rev		5`-GGC TGA CCG GGT TGG TTT-3`	

18SrRNA TaqMan- Probe		5'-ACA TGC CGA CGG GCG CTG AC-3'	
PGT-for	NM_001011 558	5'-TGCAGCACTAGGAATGCTGTTC-3'	116 bp
PGT-rev		5'-GGGCGCAGAGAATCATGGA-3'	
PGT TaqMan- Sonde		5'-TCT GCA AAC CAT TCC CCG CGT G-3'	
StAR-for	EF522840 (Kowalewski and Hoffmann, 2008)	5'-CGA GGC TCC ACC TGT GTG T-3'	65 bp
StAR-rev		5'-CCT TTC TGC TCA GGG ATC TC-3'	
StAR- TaqMan- Probe		5'-CTG GCA TGG CCA CAC ATT TC-3'	

Alle Primer und die TaqMan-Sonden wurden bei Microsynth, Balgach, CH, bestellt. Die TaqMan-Sonden stammen von Eurogentec, Seraing, Belgien.

4.3.5.3 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte als relative Quantifizierung. Hierbei wird die verstärkte oder verminderte Expression eines Zielgens unter verschiedenen Bedingungen in Verhältnis zu einem stets gleichmässig exprimierten Referenzgen gesetzt. Dieses sollte einerseits keinen experimentellen Schwankungen unterliegen, das heisst stets konstant exprimiert werden, andererseits sollte es auch eine dem Zielgen vergleichbare Reaktionseffizienz haben.

Zur Auswertung der RealTime(TaqMan)PCR wird die Fluoreszenz des Reporters ausgenutzt, welche, wie beschrieben, proportional zur Menge der amplifizierten cDNA zunimmt.

Berechnet wird hierbei der sogenannte Threshold-Cycle, C_t -Wert (Schwellenwert). Dies ist der Zyklus, ab welchem das Fluoreszenzsignal der abgebauten Sonde die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Ab Erreichen des Zeitpunktes des Threshold-Cycles findet die Amplifikation der cDNA exponentiell statt. Je mehr cDNA des Target-Gens zu Beginn der Reaktion vorhanden ist, desto weniger Zyklen sind notwendig, um den Fluoreszenzschwellenwert, also C_t , zu erreichen. Der C_t -Wert ist daher umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der cDNA-Kopien zum Startzeitpunkt der Reaktion.

Um eine Aussage treffen zu können, muss der Threshold-Zyklus des Zielgens ins Verhältnis zum C_t des Referenzgens, in unserem Fall GAPDH und 18srRNA gesetzt werden. Dies drückt

folgende Formel aus:

$$\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Zielgen}} - \Delta C_{t \text{ GAPDH}} \text{ bzw. } \Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Zielgen}} - \Delta C_{t \text{ 18srRNA}}$$

Vor der Bestimmung der relativen Expression des Target-Gens wird der $\Delta\Delta C_t$ bestimmt, welcher anschliessend zur Darstellung der relativen Genexpression genutzt werden kann.

Zur Darstellung der relativen Expression wird der Threshold-Zyklus des Kalibrators bestimmt, wobei der Kalibrator die Probe ist, welche den höchsten C_t hat, also die niedrigste Genexpression aufweist.

Der ΔC_t -Wert des Kalibrators wird von den ΔC_t -Werten aller weiteren Proben subtrahiert. Es ergibt sich folgende Formel:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Zielgen}} - \Delta C_{t \text{ Kalibrator}}$$

$\Delta\Delta C_t$ wird nun zur Darstellung der Relativen Genexpression (RGE) genutzt:

$$RGE = 2^{(-\Delta\Delta C_t)}$$

RGE drückt die n-fache Überexpression eines Gens im Vergleich mit dem Kalibrator, also der Probe mit dem niedrigsten cDNA-Gehalt, aus.

4.3.5.4 Statistische Verfahren

Zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPad3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA) eingesetzt. Da die Daten nicht gleichmässig verteilt waren, wurde eine nicht-parametrische ANOVA-Analyse durchgeführt. Weiterhin wurde der Dunnet's Multiple Comparison Test zum paarweisen Vergleich aller Beobachtungszeitpunkte angewendet.

4.4 Western Blot

Genaue Angaben zu den verwendeten Puffern und Lösungen können dem Kapitel 8.1 (Puffer und Lösungen) entnommen werden.

4.4.1 Proteinisolierung

Für den Nachweis von Proteinen wurden Zellen aus der Zellkultur mit Net2-Puffer und Proteinaseinhibitor (1 µl/10 ml Net2-Puffer, Sigma-Aldrich™ Chemie GmbH, Buchs, CH) geerntet. Hierzu wurden pro Well 150 µl Net2-Puffer-Proteinaseinhibitor-Gemisch zugefügt. Nach 15 Minuten Inkubation auf dem Schüttler wurden die Zellen mit einem speziellen Schaber (Zellschaber 24 mm, TPP®, Trasadingen, CH) vom Kulturschälchen gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde abpipettiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäss überführt.

Zur Homogenisierung wurden die Zellen auf Eis mittels Ultraschall mit dem Sonicator (Homogenisator VDI 12, VWR, Dietikon, CH) bearbeitet (15 Sekunden pro Probe).

Anschliessend erfolgte die Proteinbestimmung mittels Bradfordmethode (Bradford Quick Start, BioRad, Reinach, CH) mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers (Smart Spec TMPlus, BioRad, Reinach, CH) bei 595 nm. Die Messung erfolgte in Einwegküvetten (Semimicrovolume Cuvettes, BioRad, Reinach, CH).

Anschliessend wurden die Proben mit Net-2-Puffer und 4-fach Sample-Puffer (8.1 Puffer und Lösungen) auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

4.4.2 Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine kam ein 12 % Polyacrylamidgel zum Einsatz. Die Zusammensetzung des Gels ist in folgender Tabelle (4.4.2a) ersichtlich:

Tabelle 4.4.2a: Zusammensetzung des Gels für die SDS-PAGE

Komponenten:	Menge (in µl):
Sammelgel 5 %	
Polyacrylamid 40 % ¹	625
TRIS 1 M pH = 6,8	625
Steriles bidest. Wasser	3650
APS 10% ²	25
TEMED ³	2,5
Gesamt:	4927,5
Trenngel 12 %	
Polyacrylamid 40 % ¹	3300
TRIS 1 M pH = 8,8	3120
Steriles bidest. Wasser	5160
APS 10% ²	60
TEMED ³	6
Gesamt:	12000 (2 Gele)

1) 40 % Acrylamide/Bis Solution, MBI Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH

2) APS Ammonium Persulfate, BioRad, Rheinach, CH

3) TEMED Tetraethylenmethyldiamin, BioRad, Reinach, CH

Vor dem Beladen des Gels wurden die Proteine 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Anschliessend wurden die Taschen des Sammelgels mit den Proben gefüllt. Zur Grössenkontrolle wurde eine Tasche mit einem Molekulargewichtsmarker (PrecisionPlusProtein™, Dual Color Standards, BioRad, Rheinach, CH) befüllt. Eine Spannung von 80 V wurde bis zur Sammlung der Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel angelegt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte anschliessend bei einer Spannung von 100 V im Trenngel. Dieser Vorgang fand in einer mit Laufpuffer (siehe Kapitel 8.1 (Puffer und Lösungen)) gefüllten Kammer (Mini Protean® Tetracell, BioRad, Reinach, CH) statt.

Anschliessend wurden die Proteine mittels eines Tankblotsystems (Criterion Blotter, BioRad, Basel, CH) in Transferpuffer vom Gel auf eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran (Immuno-Blot PVDF Membran, BioRad, Basel, CH) überführt. Dieser Vorgang fand bei 100 V für 60 Minuten unter Kühlung durch ein Eisakku statt.

Nach dem Blotting wurde die Membran für 60 Minuten in einer 5 % Magermilchlösung (50 ml PBST mit 2,5 g Magermilchpulver) inkubiert.

Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher in 2,5% PBST-Milch-Lösung auf die jeweilige Konzentration verdünnt wurde. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurde die Kammer über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am Folgetag wurde die Membran nach drei 10-minütigen Waschschritten in PBST mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abermals folgten 5 Waschschriffe von jeweils 10 Minuten mit PBST, um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen.

Tabelle 4.4.2b: Liste der verwendeten Antikörper

Spezifisches Immunserum (Primärantikörper):	Verdünnung:	Sekundärantikörper:	Verdünnung:
StAR ¹	1:5000	IgG aus dem Esel gegen Kaninchen ⁶	1:15000
3βHSD ²	1:10 000	IgG aus dem Esel gegen Kaninchen ⁶	1:15000
P450 _{scc} ³	1:1000	IgG aus dem Esel gegen Kaninchen ⁶	1:15000
GAPDH ⁴	1:5000	Anti Mouse IgG ⁷	1:15000
βActin ⁵	1:1000	Anti Mouse IgG ⁷	1:15000

1) StAR-Antikörper: polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen anti human. Der StAR-Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. M. Stocco, Texas Tech University Health Sciences Center, USA, zur Verfügung gestellt (Clark et al., 1994).

- 2) Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen humanes 3 β HSD der Plazenta (Lorence et al., 1990), eine großzügige Spende von Prof. J. I. Mason, University of Edinburgh, Scotland
- 3) AntiCytochrome P450 IA2, polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen anti Ratte und Maus, MiliporeTM, Temecula, USA
- 4) GAPDH sc47724, monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen Mensch, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Vertrieb durch Labforce, Nunningen, CH
- 5) β -Actin sc81178, monoklonaler Antikörper aus der Maus, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Vertrieb durch Labforce, Nunningen, CH
- 6) Donkey Anti-Rabbit IgG, Pierce, Rockford, USA
- 7) Anti Mouse IgG, Promega, Madison, USA

Die Detektion erfolgte entweder mit dem Chemilumineszenz-Kit (Immun Star® Chemiluminescent Kit, BioRad, Basel, CH) oder dem SuperSignal®-West-Femto-Maximum-Sensitivity-Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA). Entwickelt wurden die Membranen mit dem Molecular Imager Chemie DocTM XRS+ mit der Image LabTM Software.

Nach der Detektion wurde die Membran mit 0,1 M Glyzin (pH 2,6, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, CH) über 60 Minuten behandelt, um einen weiteren Antikörper auftragen zu können.

4.4.3 Statistische Verfahren

Die auf der Membran dargestellten Banden wurden mit dem Programm ImageJ 1.38 x (Wayne Rasband, USA) mittels Densitometrie semiquantitativ ausgewertet. Der SOD-Wert (Standardized Optical Density) wurde bezogen auf die Expression von GAPDH berechnet.

Aufgrund einer ungleichmässigen Verteilung der Daten wurde eine nicht-parametrische ANOVA-Analyse durchgeführt. Zum paarweisen Vergleich der verschiedenen Stimulationsansätze wurde anschliessend der Dunnet's Multiple Comparison Test durchgeführt.

4.5 Klonierung des kaninen StAR-Promotors

Ausgehend von einer hohen Homologie im proximalen StAR-Promotor bei verschiedenen Spezies wurde von einer ähnlichen Situation für den Hund ausgegangen.

Mit der BLAST-Software wurde ein Vergleich der bekannten Maus-StAR-Promotor-Sequenz im proximalen Bereich mit der online erhältlichen genomischen Sequenz vom Hund durchgeführt (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/dog/index.html).

Aufgrund der erwarteten Sequenz des kaninen StAR-Promotors wurden mit der Oligo Express Software (Gene LinkTM, Hawthorne, USA) folgende Primer ausgewählt und bei der Firma Microsynth, Balgach, CH, bestellt:

Tabelle 4.5: Primerdesign zur Klonierung des kaninen StAR-Promotors

Primer:	Basensequenz:	Produktlänge (bp):
can StAR-Promotor forward	5`-TTG TAG GCT TTG CAA ACT GCC T-3`	255
can StAR-Promotor reverse	5`-GGA CCA GCC CGT GTT CCT GTC TTA -3`	

Die qualitative PCR wurde mit genomischer DNA aus der Adenohypophyse von zwei Hunden durchgeführt. Es war notwendig, genomische DNA zu verwenden, da der Promotorbereich in der aus mRNA transkribierten cDNA nicht vorhanden ist.

Zur Durchführung der PCR und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes siehe Kapitel 4.2.

Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH eingesetzt. Die Annealingtemperatur betrug 57° C über 1 Minute.

Ein Produkt von 255 bp wurde erfolgreich amplifiziert und in einem 2% mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäss (Safe Seal Gefäss, 1,5 ml, SARSTEDT, Nürnberg, Deutschland) überführt und gewogen. Die enthaltenen DNA-Fragmente wurden anschliessend mit dem QIAEXII Gelextraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gemäss Angabe des Herstellers aufgereinigt.

4.5.1 Klonierung in den Plasmidvektor pGEM-T®

Der pGEM-T® Vektor (pGEM-T® Vektor System, Promega, GmbH, Mannheim) ist ein linearisierter Vektor mit T-Overhangs, welche für die Ligation mit PCR-Produkten, die mit thermostabilen Polymerasen wie z.B. der GOLD-AmpliTaq Polymerase (AmpliTaq Gold®, 5 U/µl, Applied Biosystems, Roche, Basel, CH) vervielfältigt wurden, kompatibel sind.

Die Klonierung in den pGEM-T® Vektor erfolgte, um das StAR-Promotor-Fragment zu vermehren und anschliessend im Vektor zu sequenzieren. Kompetente Zellen wurden mit dem das DNA-Fragment beinhaltenden Vektor transformiert und angezüchtet, anschliessend kann man die vervielfältigte Menge DNA isolieren.

4.5.1.1 Vektoreigenschaften

Der pGEM-T® Vektor besitzt die Möglichkeit der Blau-Weiss-Selektion zur Differenzierung von Kolonien mit ligiertem Vektor von Kolonien mit leerem Vektor. Dies ist möglich, da die Schnittstelle des Vektor im lacZ-Gen sitzt, welches für das Enzym β -Galactosidase kodiert. Die β -Galactosidase spaltet X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside) zu Indoxyl (5-Brom-4-chlor-Indoxyl), welches mit Sauerstoff aus der Atmosphäre zu einem blauen Farbstoff oxidiert. Bei positiver Insertion wird dieses Gen inaktiviert, sodass das Enzym nicht mehr exprimiert wird und die positiven Kolonien im Gegensatz zu den negativen blauen Kolonien weiss bleiben. Diese Reaktion wird gezielt durch die Zugabe von IPTG (Isopropylthiogalactosid) erzielt, welches die Transkription durch Aktivierung des lac-Promotors induziert. Weiterhin enthält der pGEM-T® Vektor ein Gen für Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin, sodass pGEM-T® Vektor -positive Kolonien auf ampicillinhaltigem Nährboden angezüchtet werden können.

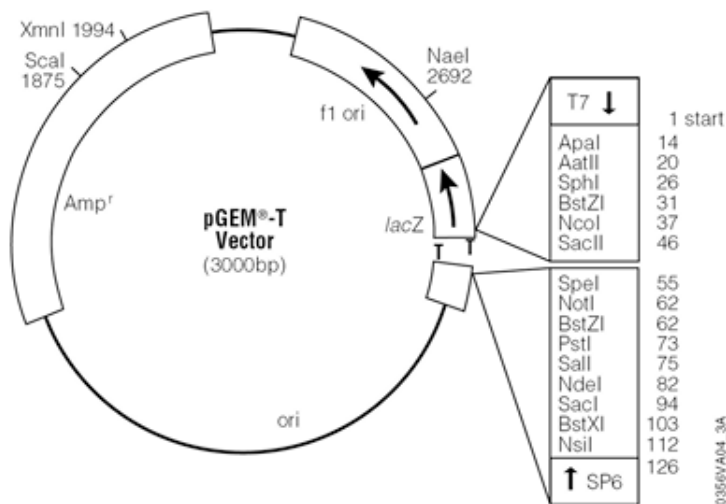


Abb. 4.5.1.1: Schema des pGEM-T Vektors (pGEM-T® Vektor System, Promega, GmbH, Mannheim) für die Ligation. Amp^r = Ampicillinresistenzgen, f1 ori = Startpunkt der Replikation, lac Z = α -Fragment des β -Galactosidasegens, beinhaltet multiple Klonierungsstellen mit flankierenden SP6- und T7-Promotoren.

4.5.1.2 Ligation

Der Ligationsansatz beinhaltet die in Tabelle 4.5.1.2 aufgeführten Komponenten.

Tabelle 4.5.1.2: Ligationsansatz

Komponenten:	Einfacher Ansatz (in µl):
2 x Rapid Ligation Buffer, T ₄ DNA Ligase*	4
pGEM-T® Vektor*	1
Insert (PCR Produkt)	4
T ₄ DNA Ligase, 3 U/µl*	1

*pGEM®-T Easy Vector System I, Promega, Madison, USA

Die Ligation der PCR-Fragmente mit dem pGEM-T® Vektor erfolgte bei 4 °C über Nacht. Anschliessend erfolgte die Transformation des Vektor in kompetente Zellen.

4.5.1.3 Transformation des Vektors in die Bakterien

Zur Transformation kamen kommerzielle kompetente E. Coli Bakterien vom Typ XL1 Blue competent cells (Stratagene Europe, Amsterdam, Holland) zum Einsatz.

100 µl der Bakteriensuspension wurden 10 µl des Ligationsproduktes zugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien in einem 42 °C warmen Wasserbad für 45 Sekunden dem sogenannten Heatshock ausgesetzt, welcher die Transformationseffizienz erhöht. Nach 2 weiteren Minuten auf Eis wurden die Bakterien in 900 µl LB-Medium [(Difco™ LB BROTH, Miller (Luria-Bertani), Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA)] bei 37 °C über 60 Minuten im Schüttler vorvermehrt. Die Ausplattierung erfolgte auf Agarplatten [(Difco™ LB AGAR, Miller (Luria-Bertani), Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) mit Ampicillinzusatz (100 µg/ml, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, CH) in Petrischalen von Sterilin Limited (Newport, UK)]. Für die Blau-Weiss-Selektion wurden die Agarplatten zunächst wie folgt präpariert: Zuerst wurden 100 µl IPTG (0,1 M, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, CH) mit einem Spatel auf der Oberfläche ausgestrichen, anschliessend 40 µl Xgal (50mg/ml, Promega, Madison, USA), anschliessend erfolgte die Lufttrocknung bei Raumtemperatur. Nun wurden 100 - 300 µl Bakteriensuspension auf den Platten ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C im Wärmeschränk (Memmert, Typ INB 400, Schwabach, Deutschland) über Nacht.

Einzelne positive Klone wurden anschliessend nach der Blau-Weiss-Selektion geerntet und jeweils in 3 ml flüssigem LB-Growth-Medium plus 3 µl 1% Ampicillinlösung bei 37 °C im Schüttler über Nacht vermehrt.

4.5.1.4 Plasmidisolation und Restriktionsverdau

Die Isolation der vermehrten Plasmide fand mit dem Pure Yield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, USA) laut Herstellerangaben statt.

Anschliessend erfolgte ein Kontrollverdau mit den Restriktionsendonukleasen Nco I und Not I, um das DNA-Fragment des StAR-Promotors aus dem Vektorplasmid auszuschneiden.

Tabelle 4.5.1.4: Ansatz für den Doppelverdau

Komponenten:	Einfacher Ansatz (in µl):
NE Buffer 3*	2
Bovines Serumalbumin BSA*	1
Not I 10 U/µl*	1
Nco I 10 U/µl*	1
Gesamt:	5

*Alle Komponenten stammen von New England Biolabs Inc, Frankfurt a.M., Deutschland

5 µl Restriktionsansatz wurden mit 15 µl gelöster Plasmid-DNA in einem 0,5 ml Reaktionsgefäss (Safe Seal Gefäss, 0,5 ml. SARSTEDT, Nürnberg, Deutschland) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einer Hitzeinaktivierung der beiden Enzyme bei 65 °C über 20 Minuten erfolgte die Darstellung der Restriktionsprodukte auf einem 1,5 % Agarosegel mit Ethidiumbromid um die Größe der Inserts zu überprüfen. Ein Teil der vervielfältigten DNA-Fragmente wurde zur Sequenzierung (Microsyth, Balgach, CH) geschickt, um eine Bestätigung darüber zu erhalten, dass tatsächlich das erwünschte Fragment amplifiziert wurde und um die exakte hundespezifische Sequenz zu ermitteln.

4.6 Messung der Aktivität des kaninen StAR-Promotors im Luziferaseassay

4.6.1 Grundlagen des Luziferaseassays

Beim Luziferaseassay wird die Fähigkeit des Enzyms Luziferase ausgenutzt, um ein spezifisches Substrat (Luziferin) umzusetzen, wobei Biolumineszenz auftritt. Das entstehende

Lichtsignal wird detektiert und ausgewertet. Somit kann das Luziferasegen als sogenanntes Reportergen genutzt werden. Der kommerziell erhältliche PGL3-Basic Vector (pGL3 Basic Vector, Luciferase Reporter Vectors, Promega, Madison, USA) enthält dieses Reportergen für die Fireflyluziferase. Vor diesem Gen befindet sich im Plasmid ein Bereich mit möglichen Schnittstellen, an welchem ein Promotor eingefügt werden kann, dessen Aktivität untersucht werden soll. Entsteht ein starkes Lichtsignal, ist die Expression der Luziferase hoch. Die Expression der Luziferase korreliert also mit der Transkriptionsaktivität des eingefügten Promotors.

4.6.2 Renilla-Kontrollkonstrukt

Um den Einfluss von Schwankungen in Transfektionseffizienz und Anzahl der lysierten Zellen auf das Ergebnis zu verringern, erfolgt stets eine Kotransfektion mit einem Kontrollplasmid, in unserem Fall pRL-SV40, das die Luziferase von Renilla reniformis beinhaltet, welche unter der Kontrolle eines konstitutiven pCMV-Promotors exprimiert wird. Das Lichtsignal, welches durch die Renilla-Luziferase generiert wird, ist stets konstant und kann somit als Referenz für das variierende Signal der Firefly-Luziferase dienen.

4.6.3 Klonierung in den Plasmidvektor pGL3-Basic Vector

Um in einem ersten Schritt die Funktionalität des sequenzierten kaninen StAR-Promotors nachzuweisen und weiterhin die Effekte einer Stimulation mit cAMP bzw. PGE₂ auf die Aktivität des Promotors zu messen, fanden eine Ligation des kaninen StAR-Promotors mit dem pGL3-Vektor, die Transformation kompetenter Zellen mit dem ligierten Vektor und eine Promotoraktivitätsmessung im Luziferaseassay statt.

Nach der positiven Sequenzierung des mit den Primern aus Tabelle 4.5 amplifizierten StAR-Promotors, wurden weitere Primer entworfen, welche eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen XhoI im Forwardprimer respektive HindIII im Reverseprimer beinhalteten (siehe Tabelle 4.6.3). Abermals erfolgte die Amplifizierung des kaninen StAR-Promotors mittels PCR, seine Darstellung im Agarosegel und die Aufreinigung der aus dem Gel ausgeschnittenen Banden wie unter 4.5 beschrieben. Auch das weitere Vorgehen zur Vermehrung des Konstrukts im pGEM-T® Vektor entspricht dem unter 4.5.1.3 beschriebenen Protokoll.

Tabelle 4.6.3: Zur Klonierung in den pGL3-Basic Vector verwendete Primer

Primer:	Basensequenz:	Produktlänge (bp)
can StAR-Promotor forward, flankiert von der Erkennungsstelle für XhoI (unterstrichen)	5`-TAG <u>CTC GAG</u> TTG TAG GCT TTG CAA ACT GCC T-3`	255
can StAR-Promotor reverse, flankiert von der Erkennungsstelle für HindIII (unterstrichen)	5`-CTA <u>AAG CTT</u> GGA CCA GCC CGT GTT CCT GTC TTA -3`	

4.6.3.1 Restriktionsverdau

Um passende Enden des DNA-Fragments zum Einfügen in den Vektor, die sogenannte sticky-end-Ligation, zu schaffen, wurde das Konstrukt pGEM-T® Vektor/kaniner StAR-Promotor mit den Restriktionsenzymen XhoI und HindIII geschnitten. Auf die gleiche Weise wurde der pGL3-Basic Vector vorbereitet.

Der Doppelverdau fand in folgendem Restriktionsansatz statt:

Tabelle 4.6.3.1: Ansatz für den Restriktionsverdau

Komponenten:	Einfacher Ansatz (in µl):
Steriles bidest. Wasser	1
BSA 100%*	1
NEBuffer3, 10x*	1
XhoI*	1
HindIII*	1
Plasmid-DNA (pGEM-T® Vektor /kaniner StAR-Promotor oder pGL3-Basic Vector)	5
Gesamt:	10

*alle Komponenten von New England Biolabs Inc, Frankfurt a.M., Deutschland

Die Reaktionsbedingungen waren 37 °C über 60 Minuten.

Anschliessend erfolgte die Gelaufftrennung und die Gelextraktion mittels des QIAEX-Gelextraktionskits.

4.6.3.2 Ligation

Die Ligation erfolgte bei 37 °C für 60 Minuten mit folgendem Ligationsansatz:

Tabelle 4.6.3.2: Ligationsansatz

Komponenten:	Einfacher Ansatz (in µl)
Steriles bidest. Wasser	2
pGL3-Basic Vector	4
Insert (Canine StAR-Promotor)	4
2 x Rapid Ligation Buffer, T ₄ DNA Ligase*	8
T ₄ DNA Ligase, 3 U/µl*	2
Gesamt:	20

*Promega, Madison, USA

4.6.3.3 Transformation, Plasmidisolation und Kontrollverdau

10 µl des Ligationsansatzes wurden verwendet, um kompetente XL1Blue Bakterien mit dem pGL3-Vektor Konstrukt zu transformieren. Nach der Auswahl einzelner gewachsener Kolonien wurden diese in LB vermehrt und das Plasmid anschliessend isoliert. Auf den Kontrollverdau folgte die Darstellung im 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid und die Gelextraktion. Das extrahierte Fragment aus einem der Klone wurde weiterhin zur Identifizierung der Sequenz eingeschickt (Microsynth, Balgach, CH).

4.6.4 Transfektion der primären kaninen Luteinzellen mit dem pGL3/-250/-1 kaninen StAR-Promotor-Konstrukt

Nach der erfolgreichen Vermehrung des pGL3/kaninen StAR-Promotorkonstrukts fand die Transfektion primärer Luteinzellen statt, welche steroidogene Eigenschaften haben.

Die Transfektion erfolgte unter Verwendung von FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche, Basel, CH) in einem 6-well-plate (TPP®, Zellkulturplatte 6, Trasadingen, CH) .

Die Zellen wurden mit pGL3/-255/-1 kaninem StAR-Promotor und pRL-SV40, ein Vektor, der die Renilla Luziferase konstitutiv exprimiert (pRL-SV40 Vector, Promega, Madison, USA), kotransfiziert.

Bei der Kalkulation der zu verwendenden Mengen der einzelnen Reagenzien ist folgendes zu beachten:

Das Verhältnis von eingesetzter DNA zum Reagenz FuGENE® HD soll 1: 3,5 sein, das heisst, dass pro 1 µg DNA 3,5 µl Transfektionsreagenz eingesetzt werden sollen. Es wurden 650 ng DNA von pGL3/kaninem StAR-Promotor pro Kulturschälchen verwendet, vom pRL-SV40 Vector nur 20 ng DNA. Pro Well wurden 100 µl Transfektionsansatz bestehend aus FuGENE® HD, serumfreiem Medium DMEM/Ham's F-12 ohne sonstige Zusätze und den Konstrukten pGL3/-255/-1 kaniner StAR-Promotor und pRL-SV40 Vector eingesetzt.

Das serumfreie Medium wurde mit dem FuGENE ®HD gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde die DNA zugefügt und der Ansatz dann wiederum 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen in den Wells bereits mit warmem PBS gewaschen und es wurden pro Well 1,5 ml DMEM/Ham's F-12 mit Zusätzen (Zusammensetzung laut Tabelle 4.2.1) eingefüllt. Nach Ablauf der 25 Minuten wurden pro Well 100 µl des Transfektionsansatzes zugesetzt. Nach sechs Stunden im Wärmeschrank wurde das zur Transfektion eingesetzte Medium abgesaugt und durch frisches Kulturmedium (siehe Tabelle 4.2.1) ersetzt. Die Stimulation der transfizierten Zellen erfolgte 48 Stunden später.

4.6.5 Stimulation der transfizierten Zellen für Luziferaseassay

Die transfizierten Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen dbcAMP (2'-0-Dibutyryladenosen 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, CH) oder PGE₂ (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, CH) stimuliert. Pro Konzentration wurden jeweils zwei Wells stimuliert, wobei ein Paar Kulturschälchen als Negativkontrolle mit Medium ohne Stimulanz angesetzt wurde. In einem Vorversuch fand die Stimulation der Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von dbcAMP statt. Die Stimulation fand im Doppelansatz statt, zum Einsatz kamen die Konzentrationen 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM und 1,0 mM dbcAMP. Anschliessend wurde dosisabhängige Wirkung von PGE₂ getestet, die Stimulation erfolgte abermals im Doppelansatz. Als Positivkontrolle wurden zwei Kulturschälchen mit 0,5 mM dbcAMP stimuliert. Die Stimulation mit PGE₂ erfolgte in den Konzentrationen 1 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM PGE₂. Diese Versuche wurden jeweils dreimal wiederholt.

Nach der Vorbereitung der Stimulationsansätze aus serumfreiem Kulturmedium und den kalkulierten Mengen dbcAMP oder PGE₂ wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen und nun mit dem Stimulationsansatz für 6 Stunden bei 37° Grad inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit Lysispuffer (Passive Lysis Buffer, Promega, Madison, USA) durch Zellyse abgetötet und vom Kulturboden gelöst. Das entstandene Gemisch wurde zur Durchführung des Luziferaseassays verwendet.

Zur Durchführung des Luziferaseassays wurden in eine 96-Well-Plate (Flat Bottom Microplates, Chromalux, Dynex Technologies, Chantilly, USA) pro Well 10 µl Zelllysats aus dem Stimulationsversuch pipettiert.

Die Detektion des Lichtsignals erfolgte im Lumineszenzspektrometer (MLX Microplate Luminometer, Dynex Technologies, Chantilly, USA) unter Verwendung des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems (Promega, Madison, USA).

4.7 Stimulation der primären Luteinzellen

Neben der Stimulation transfizierter Zellen für die Messung der Promotoraktivität im Luziferaseassay fand eine Stimulation nativer Luteinzellen mit PGE₂ oder dbcAMP statt. Um die Auswirkungen der Stimulation auf die Steroidogenese zu untersuchen, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt:

Nach der Stimulation der Zellkultur wurde die Expression von StAR auf der mRNA-Ebene mittels der semi-quantitativen RealTime(TaqMan)PCR ermittelt. Die Expression von 3βHSD, StAR und P450scc auf Proteinebene wurde im Western Blot ermittelt. Weiterhin erfolgte 6 Stunden nach der Stimulation mit PGE₂ oder dbcAMP eine Progesteronmessung im Kulturmedium der Zellen mittels RIA. Die Bestimmung von Progesteron im Kulturmedium erfolgte nach dem von Hoffmann et al. (1973) beschriebenen radioimmunologischen Verfahren.

Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

4.7.1 Stimulationsschema

Die Stimulation erfolgte im Doppelansatz im 6-Well-Plate, wobei ein Paar Kulturschälchen als Nativkontrolle unstimuliert blieb. Von den restlichen vier Schälchen wurden zwei mit 0,5mM dbcAMP und zwei mit 20 µM PGE₂ behandelt.

Pro Well wurden 1,5 ml Stimulationsansatz eingesetzt, wobei ein serumfreies Kulturmedium verwendet wurde. Nach dem Waschen der Zellen mit 37 °C warmem PBS wurde der

Stimulationsansatz zugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über 6 Stunden im Brutschrank.

4.7.2 Ernte der Zellen

Nach 6 Stunden erfolgte die Ernte der stimulierten Zellen. Das Kulturmedium wurde vorsichtig abpipettiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -20 °C bis zur Progesteronbestimmung gelagert. Nach dem Waschen der Zellen mit kaltem PBS wurde ein Well des Doppelansatzes mit 0,5 ml Trizol® für die nachfolgende RNA-Isolation geerntet, das andere Well wurde mit 150 µl Net2-Puffer für die Proteinbestimmung im Western Blot lysiert.

Zur Weiterverarbeitung der Proben siehe die entsprechenden Kapitel zu RealTime(TaqMan)PCR (4.3) und Western Blot (4.4).

4.8 Immunhistochemie

Mit der Immunhistochemie soll die Gewebeverteilung des PGT dargestellt werden. Zum Einsatz kamen Gewebeschnitte von Gelbkörpern in den verschiedenen Phasen der Trächtigkeit. Für den immunhistochemischen Nachweis von PGT wurde die indirekte Peroxidasemethode angewendet. Hierbei richtet sich der primäre Antikörper gegen das darzustellende Protein. Ein sekundärer, biotinylierter Antikörper bindet an den Primärantikörper und geht weiterhin eine hochaffine Bindung mit Avidin-Enzymkomplexen ein. Als Enzym kommt eine Peroxidase zum Einsatz. Bei Zugabe eines Substrates für die Peroxidase findet eine Farbreaktion statt, welche sich in einer bräunlichen Anfärbung an der Stelle der Antikörperhaftung im histologischen Schnitt äußert.

Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Antikörper aus der Ziege in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt (PGT (G-17) sc-103085, affinity purified goat polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Vertrieb durch Labforce, Nunningen, CH).

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter IgG-Antikörper gegen die Ziege aus dem Pferd in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt (biotinylated anti goat IgG, made in horse, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA).

Als Negativkontrolle wurden Schnitte aller Gewebe mitbehandelt, ohne jedoch den Primärantikörper aufzutragen. Dies dient dem Ausschluss falsch positiver Färbung durch unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers.

Als Isotypenkontrolle wurde bei Schnitten aller Gewebe statt des ersten Antikörpers IgG einer nicht immunisierten Ziege in der gleichen Konzentration wie der primäre Antikörper eingesetzt (Goat IgG, Vector laboratories, Inc., Burlingame, USA).

Die 3 µm dicken paraffinierten Gewebeschnitte wurden mit dem Rotationsmikrotom

(RM1160®, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland) angefertigt und auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost Plus®, Menzelgläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Der Einsatz erfolgte nach der Trocknung bei 37 °C im Wärmeschränk über Nacht.

Die genauen Arbeitsschritte können der Tabelle 4.8 entnommen werden.

Die Zusammensetzung der Lösungen ist unter 8.1 (Puffer und Lösungen) aufgeführt.

Tabelle 4.8: Arbeitsprotokoll für die Immunhistochemie

Arbeitsschritt:		Bemerkung:
Tag 1		
Absteigende Alkoholreihe	2 x 10 min Xylol	Entparaffinisierung und Rehydrierung
	2 x 2 min Ethanol 100 %	
	2 min Ethanol 96 %	
	2 min Ethanol 70 %	
Spülen	5 min in fließendem Wasser	
10 M Zitratpuffer	5 min Zitratpuffer bei Raumtemperatur	Demaskierung der durch Formalin vernetzten Proteine
	3 x 5 min bei 100 °C in der Mikrowelle (560 W) aufkochen	
	20 min bei RT abkühlen lassen.	
Spülen	5 min in fließendem Wasser	
0,3 % H ₂ O ₂ in Methanol	30 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur	Blockierung der endogenen Peroxidase
Spülen	IHC-Puffer	
Coverplates ¹	Objektträger auf Coverplates aufbringen	
	2 x mit IHC-Puffer spülen	
Proteinblock	Inkubation mit 10 % Serum aus dem Pferd ² , 150 µl für 20 min	Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen (verhindert unspezifische Anfärbung)

Primärer Antikörper	Auftragen des primären Antikörpers, verdünnt in IHC-Puffer, ca 90 µl/Schnitt. Inkubation über Nacht im Kühlschrank	
2. Tag		
Spülen	2 x 5min mit IHC-Puffer spülen	
Sekundärer Antikörper	Auftragen des Sekundärantikörpers, in IHC-Puffer verdünnt, Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur	Biotinylierter zweiter Antikörper bindet an Primärantikörper
Spülen	1 x 5 min mit IHC-Puffer spülen	
ABC-System ³	90 µl ABC-System/Schnitt für 60 min	Avidin-Biotin-Komplexe bilden sich aus
Spülen	1 x 5 min IHC-Puffer	
Von Coverplates abnehmen		
Chromogenzugabe ⁴	90 µl/Schnitt DAB-Chromogen unter Sichtkontrolle bis zur gewünschten Intensität anfärben	DAB-Chromogen als Substrat für Peroxidase, Sichtbarmachung des Signals
Spülen	10 min fließendes Wasser	
Gegenfärbung	1 x kurz in Hämalaulösung ⁵ in Wasser (1:1) eintauchen	Darstellung von Zellstrukturen
Spülen	5 min fließendes Wasser	
Aufsteigende Alkoholreihe	1 x kurz Ethanol 70 %	Dehydrierung
	2 x 2 min Ethanol 96 %	
	2 x 2 min Ethanol 100 %	
	2 x 5 min Xylol	
Eindecken	Fixierung mit Eindeckmittel ⁶	

1) Coverplates, Shandon Coverplates™ Cheshire, UK

2) Normal Horse Serum, Vector laboratories, Inc., Burlingame, USA

3) ABC-System, Vectastatin ABC Kit, Vector laboratories, Inc., Burlingame, USA

- 4) Chromogen DAB, Liquid DAB+Substrate, Dako, Baar, CH
- 5) Hämaun Mayer sauer KA, Kantonsapotheke Zürich
- 6) Eindeckmittel, Pertex®, HistoLab®Products AB, Gothenburg, Schweden

Die Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop (Leica, DMLB®, Leica Microsystems, Glattbrugg, CH) ausgewertet. Bilder des immunhistochemischen Nachweises wurden mit einer computerisierten Digitalkamera Colorview 12, Leica Microsystems, Glattbrugg, CH) und der Software analySIS Pro® (Version 5.0, Soft Imaging System GmbH) aufgenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Isolation und Kultivierung von Luteinzellen aus dem Corpus luteum

Die Isolierung von primären Luteinzellen aus dem Corpus luteum des Hundes wurde erfolgreich etabliert. Zellwachstum fand unter den geschilderten Bedingungen (vgl. 4.2.1) bis zur Konfluenz statt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Proliferation und Responsibilität der Luteinzellen auf die Stimulation mit trophischen Substanzen nur bei einer Isolation bis zirka Tag 21 post ovulationem gewährleistet waren. Eine Zellgewinnung zu einem späteren Zeitraum erbrachte unbefriedigende Ergebnisse. Die Isolation der Zellen muss somit in der frühen Gelbkörperphase erfolgen.

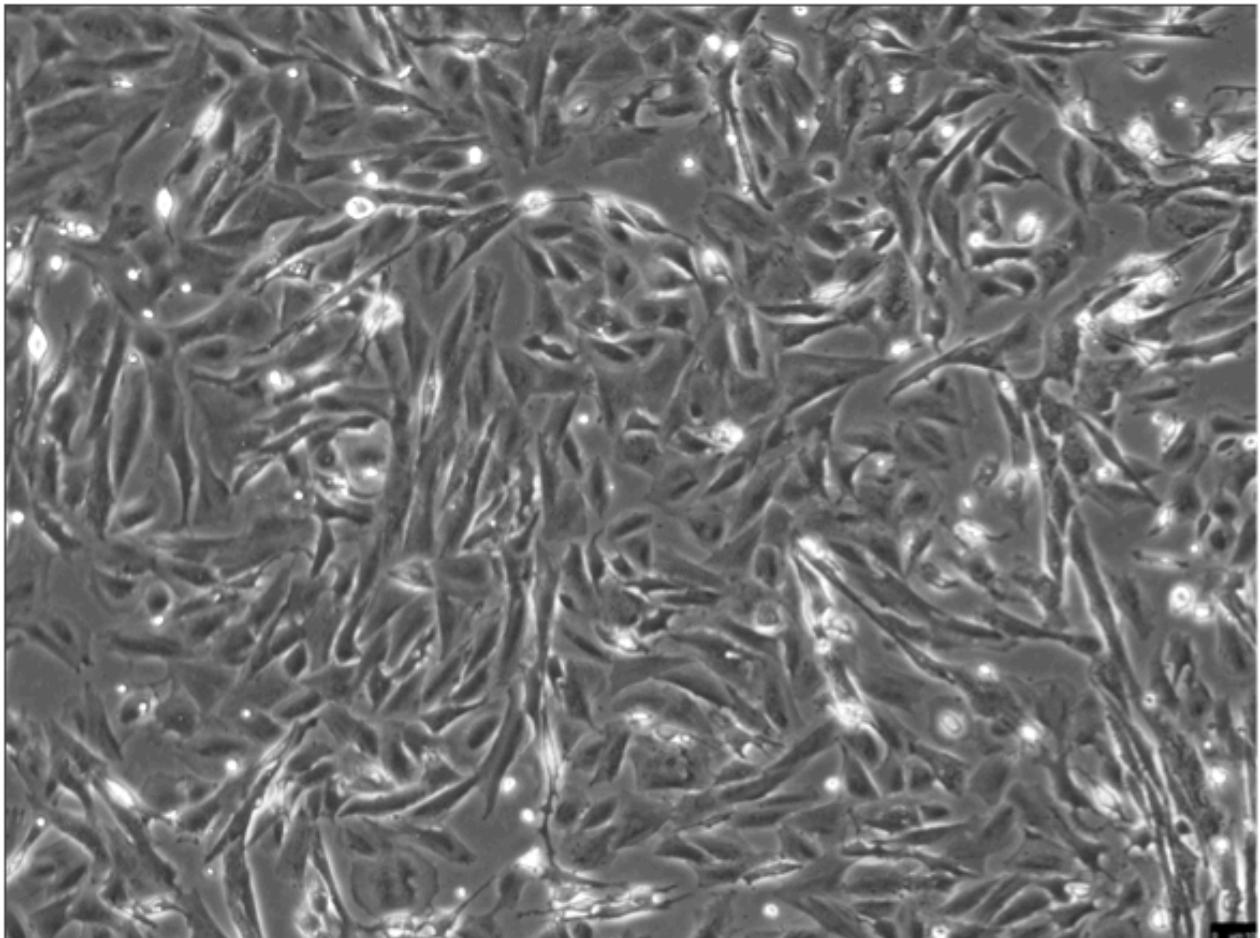
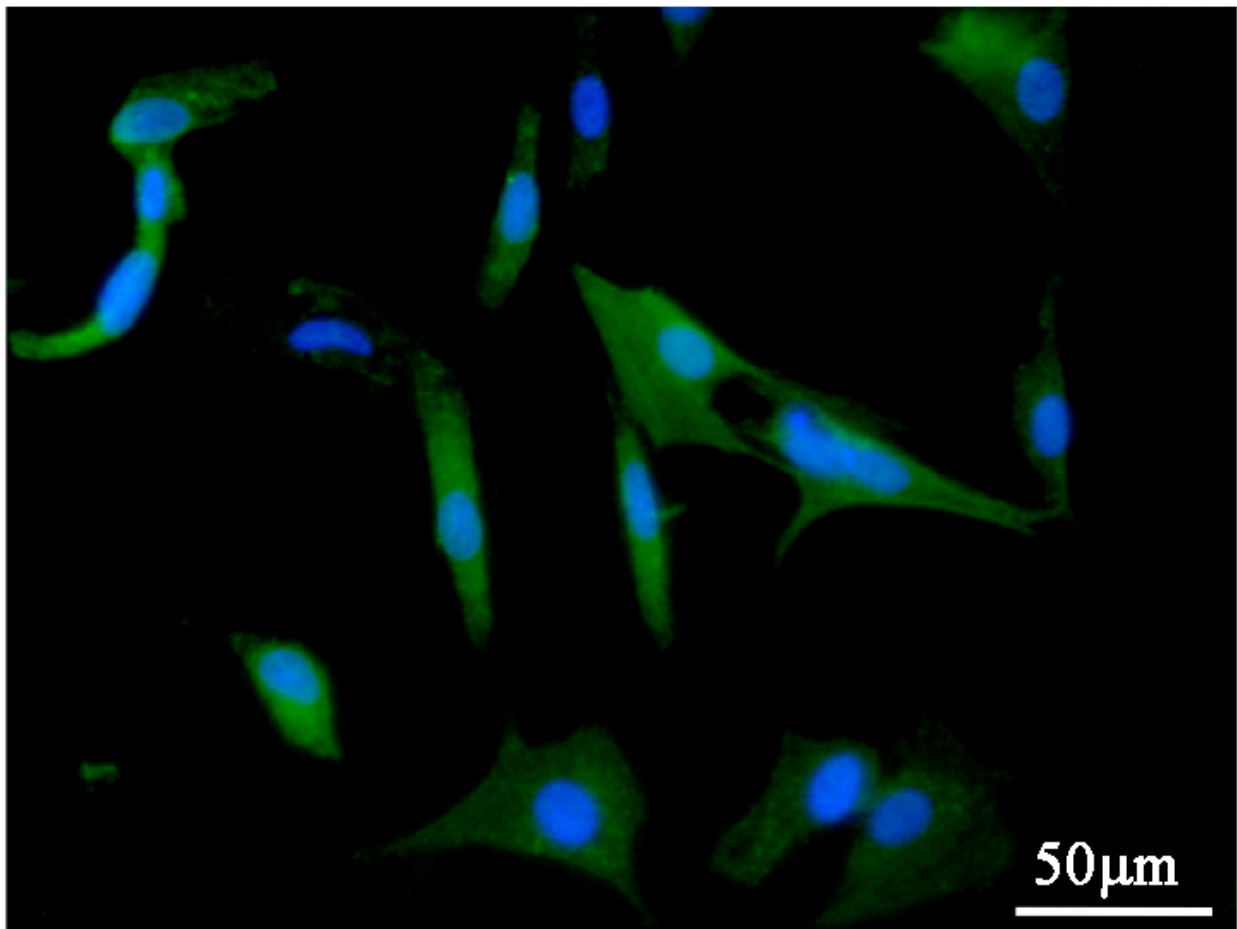
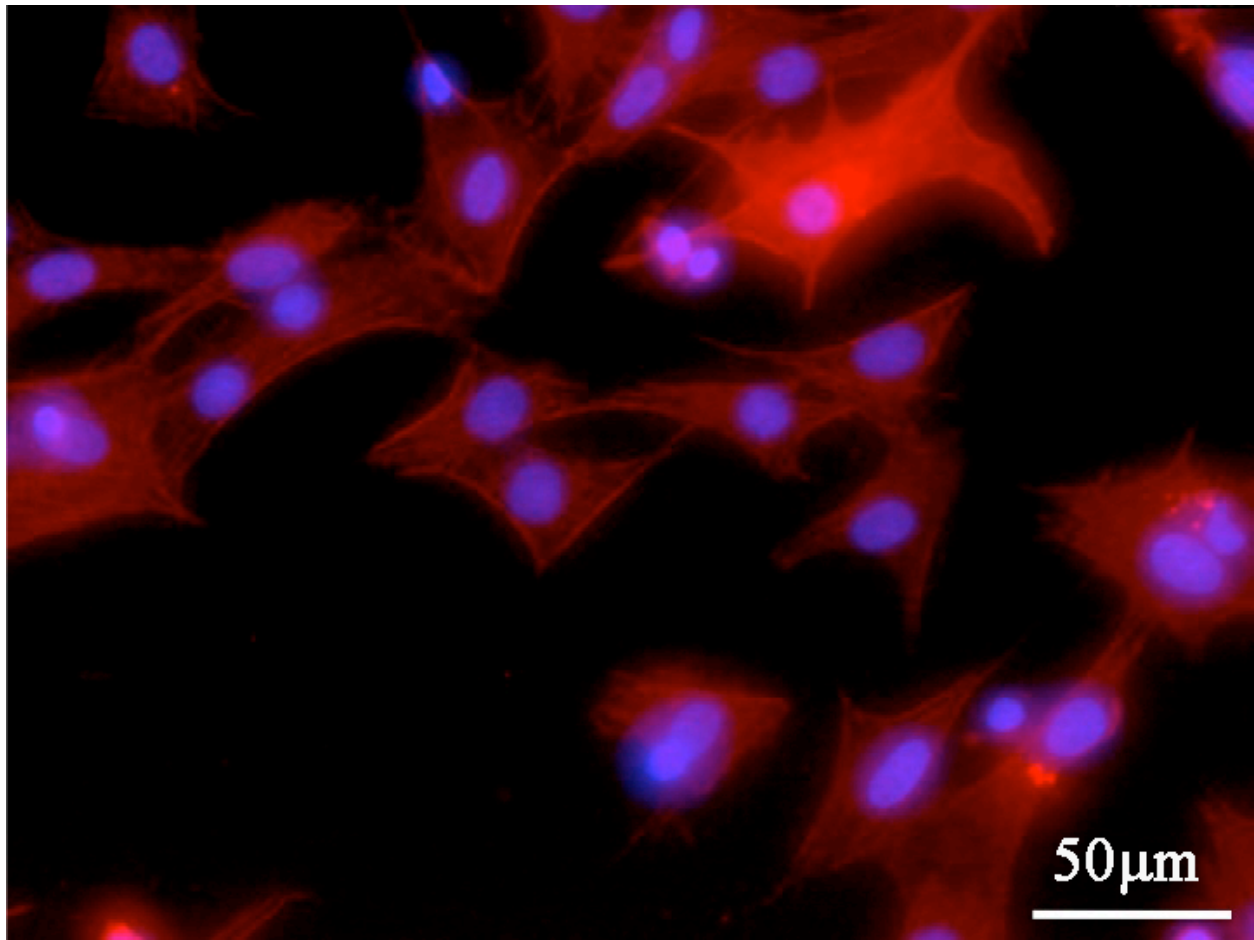


Abb. 5.1a: Primäre Luteinzellkultur des Hundes, früher Diöstrus, zirka Tag 21 p.o.

Die steroidogene Identität der isolierten Zellen konnte mittels der Immunfluoreszenzfärbung bestätigt werden. Nach der Fixierung der kultivierten Zellen auf Deckgläschen konnte der indirekte Nachweis von StAR-Protein und 3 β HSD, zwei für die Steroidogenese essentiellen Faktoren, mit einem spezifischen Primärantikörper und einem immunfluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper erbracht werden. Im Fluoreszenzmikroskop konnten jeweils StAR oder 3 β HSD im Zytoplasma der Luteinzellen dargestellt werden. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mit DAPI.



**Abb. 5.1b: Primäre Luteinzellkultur des Hundes, Nachweis von 3 β HSD (grün) mittels Immunfluoreszenzfärbung im Zytoplasma;
Kerne von Luteinzellen blau**



**Abb. 5.1c: Primäre Luteinzellkultur des Hundes, Nachweis von StAR (rot) mittels Immunfluoreszenzfärbung im Zytoplasma;
Kerne von Luteinzellen blau**

5.2 Homologievergleich und Klonierung des kaninen StAR-Promotors

Nachdem Kowalewski et al. den Open-Reading-Frame für das kanine StAR-Protein kloniert hatten (Kowalewski and Hoffmann, 2008), wurde in einem weiteren Homologievergleich die Sequenz des kaninen StAR-Promotors ermittelt.

Durch ein Alignement der bekannten Sequenz des murinen proximalen StAR-Promotors gegen die kanine genomische Sequenz konnte ein -255/-1 bp grosses Fragment auf Chromosom 16 der kaninen DNA mit einer hohen Homologie zur murinen DNA identifiziert werden. Die Auswahl spezifischer Primer mithilfe der BLAST-Software aufgrund dieses Homologievergleichs ermöglichte die Amplifizierung eines 255 bp grossen Fragmentes aus genomischer DNA des Hundes. Die Sequenzierung bestätigte die Identität des nachgewiesenen Fragments als kaniner StAR-Promotor.

Aufgrund der starken Konservierung und somit hohen Homologie dieses DNA-Abschnittes konnten Bindungsstellen für sämtliche Transkriptionsfaktoren des StAR-Promotors vorhergesagt werden (Abb. 5.2).

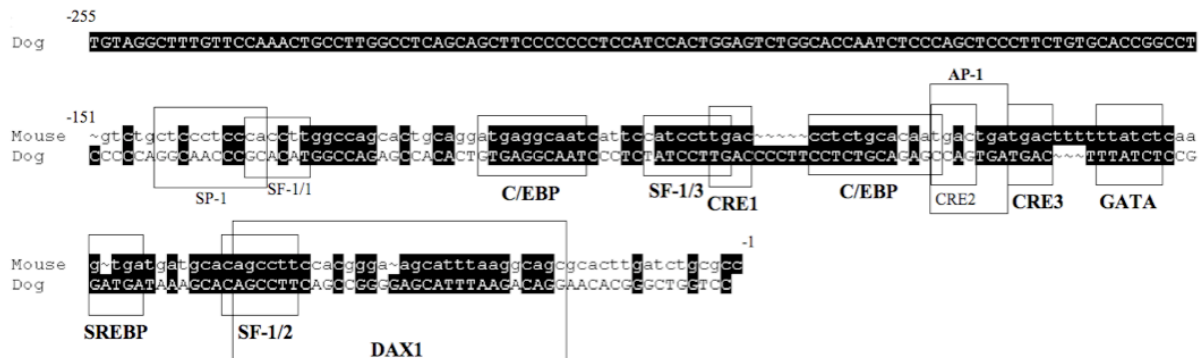


Abb. 5.2: Homologievergleich des proximalen -255/-1 kaninen StAR-Promotors mit dem Maus-Promotor. Mit Rahmen hervorgehoben sind Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren des murinen StAR-Promotors. Die schwarze Färbung zeigt eine Übereinstimmung der Sequenzen, fettgeschrieben sind vorhergesagte Bindungsstellen im kaninen Promotor.

Die Klonierung des kaninen StAR-Promotors ermöglichte die Ligation des Promotors mit einem Transfektionsvektor.

5.3 Transfektion primärer Luteinzellen und Messung der Promotoraktivität im Luziferaseassay

Nach einer Vorvermehrung des kaninen StAR-Promotors (-255/-1bp) mithilfe des PGEM-T-Vektors in kompetenten E. Coli-Bakterien wurde das genannte DNA-Fragment erfolgreich mit dem pGL3-Vektor ligiert. Die Kotransfektion von primären Luteinzellen mit dem pGL3/-255/-1 kaninen StAR-Promotorkonstrukt und dem Kontrollkonstrukt pRL-SV40 ermöglichte eine Messung der Promotoraktivität im Luziferaseassays. Hierbei wurde die Intensität des Lichtsignals gemessen, welche je nach Aktivität des kaninen StAR-Promotors variierte. Als Referenz diente das Signal der konstitutiven Renillaluziferase.

Die konzentrationsabhängige Aktivitätszunahme des kaninen StAR-Promotors nach Stimulation mit dbcAMP konnte im Luziferaseassay gezeigt werden (Abb. 5.3a). Neben einer nicht stimulierten Kontrollgruppe wurde mit 0,1, 0,25, 0,5 und 1,0 mM dbcAMP stimuliert. Hierbei war die Aktivitätszunahme des Promotors nach der Stimulation mit 0,5 oder 1,0 mM dbcAMP zur Kontrolle signifikant ($p=0,0003$). Zum Vergleich der einzelnen Gruppen mit der

unbehandelten Kontrollgruppe (*) wurde anschliessend der Dunnet's Multiple Comparison Test durchgeführt, wobei (**) $p < 0,01$ und (***) $p < 0,05$ anzeigt.

Die Funktionalität des StAR-Promotors und seine dosisabhängige Sensitivität gegenüber der Stimulation mit dbcAMP wurden somit bewiesen.

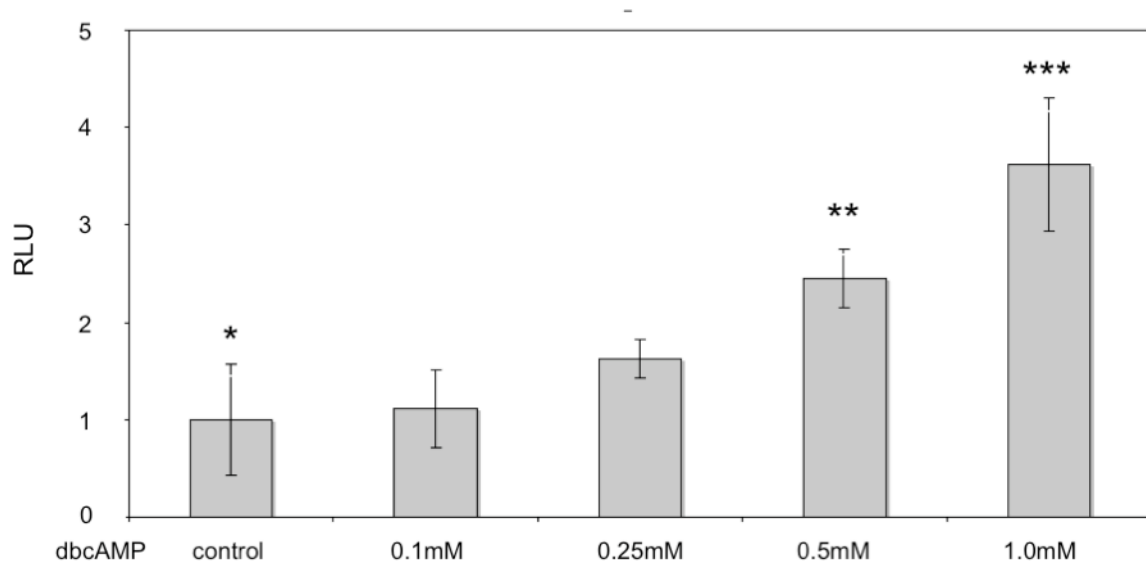


Abb. 5.3a: Dosisabhängige Aktivität des kaninen StAR-Promotors (-255/-1) im Luziferaseassay nach Stimulation mit dbcAMP. Verschiedene Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen (* zu ** $p < 0,05$, * zu * $p < 0,01$). RLU: *Relative Light Units*.**

Der Effekt einer Stimulation mit PGE_2 auf die Aktivität des kaninen StAR-Promotors konnte durch den Einsatz verschiedener Konzentrationen von PGE_2 gezeigt werden (Abb. 5.3b). Neben einer nicht stimulierten Probe, welche als Negativkontrolle diente und einer mit 0,5 mM dbcAMP stimulierten Probe, welche die Positivkontrolle darstellte, wurden die transfizierten Luteinzellen mit 1, 5, 10, und 20 μM PGE_2 stimuliert. Die Auswertung im Luziferaseassay ergab eine signifikante Aktivitätszunahme des Promotors bei der Stimulation mit 20 μM PGE_2 . Die Positivkontrolle zeigte im Vergleich zur Negativkontrolle im Luziferaseassay ebenfalls eine signifikant erhöhte Promotoraktivität ($p = 0,0023$). Der anschliessende Dunnet's Multiple Comparison Test zum Vergleich der Gruppen mit der Kontrollgruppe (*) ergab für (**) $p < 0,01$. Somit konnte bestätigt werden, dass die Stimulation mit PGE_2 zu einer verstärkten Aktivität des kaninen StAR-Promotors in Luteinzellen führt.

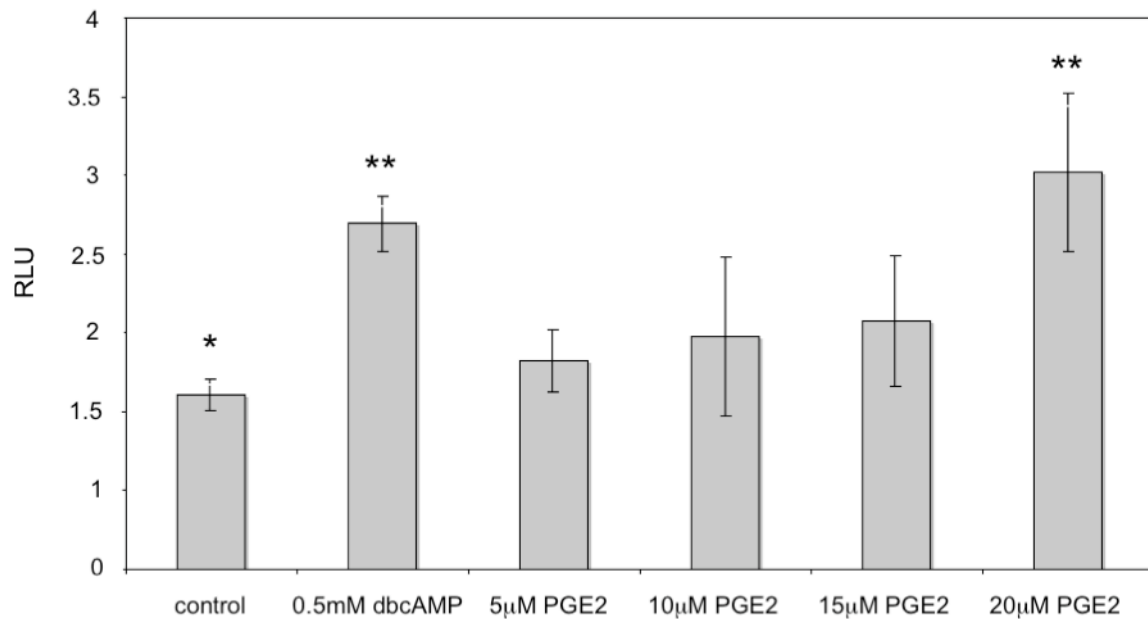


Abb. 5.3b: Aktivität des kaninen StAR-Promotors (-255/-1) im Luziferaseassay nach Stimulation mit dbcAMP und verschiedenen Konzentrationen von PGE₂. Verschiedene Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen (* zu ** $p < 0,01$). RLU: *Relative Light Units*.

5.4 Stimulation primärer Luteinzellen

Um darzustellen, ob und auf welcher Ebene PGE₂ die Steroidogenese im CI stimuliert, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt:

Nach der Stimulation kaniner Luteinzellen mit PGE₂ wurde die Expression von StAR auf der mRNA-Ebene mittels der semi-quantitativen Real Time (TaqMan) PCR ermittelt. Die Expression der Proteine 3βHSD, StAR und P450scc wurde im Western-Blot ermittelt. Weiterhin erfolgte sechs Stunden nach der Stimulation mit PGE₂ oder dbcAMP eine Progesteronmessung im Kulturmedium der Zellen mittels RIA. Alle Experimente an Zellkulturen wurden mindestens dreimal wiederholt, wobei jedesmal Lutealzellen aus einem anderen Individuum verwendet wurden.

5.4.1 RealTime(TaqMan)PCR

In der RealTime(TaqMan)PCR konnte eine verstärkte Expression auf mRNA-Level von StAR sowohl für die mit dbcAMP stimulierte Positivkontrolle als auch für die mit 20 µM PGE₂ stimulierte Zellkultur im Vergleich zur Negativkontrolle gezeigt werden. Die Expression von StAR-mRNA war signifikant um 3,75- ($p < 0,01$) bzw. 2.3-fach ($p < 0,05$) erhöht (Abb. 5.4A)

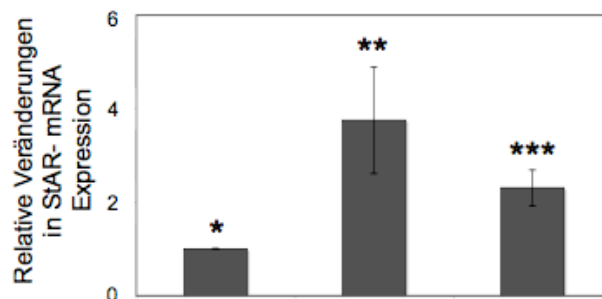
5.4.2 Western Blot

Ein ähnliches Ergebnis zeigte der Western Blot. Nachdem die Proteine durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt worden waren, wurden sie unter Verwendung spezifischer Antikörper mithilfe der Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dargestellt wurden die Proteine StAR, 3 β HSD und P450_{scc} mit den entsprechenden Banden bei 30 kDa, 42 kDa, 45 kDa. Während 3 β HSD und P450_{scc} in allen drei Gruppen keine Unterschiede in der Intensität der Banden aufwiesen, konnte für StAR eine stimulationsabhängige Verstärkung der Proteinexpression sowohl für die mit dbcAMP als auch für die mit PGE₂ stimulierte Zellkultur im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Die Signalstärke der dargestellten Banden wurde als optische Dichte SOD (Standardized Optical Density) gemessen und auf die Expression von GAPDH als Housekeeping-Gen bezogen. Die SOD von StAR wurde relativ zur unbehandelten Kontrolle gezeigt. Ein parametrischer ANOVA-Test war mit $p=0,0001$ signifikant. Im Dunnett's Multiple Comparison Test war die Expression von StAR sowohl nach der Behandlung mit dbcAMP als auch mit PGE₂ im Vergleich zur Kontrolle mit $p<0,01$ signifikant (Abb. 5.4B).

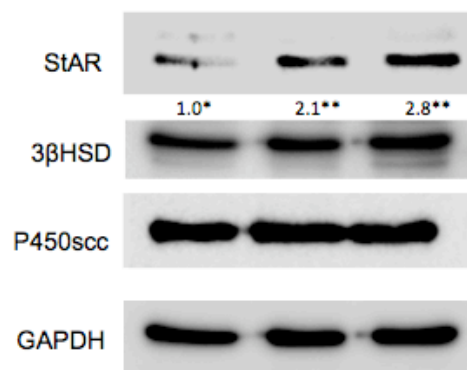
5.4.3 Progesteronmessung im Radioimmunoassay (RIA)

Die Bestimmung der Progesteronkonzentration im Kulturmedium mittels RIA zeigte eine signifikante Konzentrationssteigerung nach der Stimulation mit sowohl dbcAMP als auch PGE₂. Ein parametrischer ANOVA-Test war mit $p=0,0265$ signifikant. Der Dunnett's Multiple Comparison Test zeigte eine signifikante Abweichung der Messungen von $p<0,05$ nach dbcAMP und PGE₂ im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle. Die gesteigerte Progesteronsynthese zeigt, dass das neu synthetisierte StAR-Protein somit funktionell und aktiv ist (Abb. 5.4C).

**A: RealTime-
(TaqMan)PCR**



B: Western Blot



C: Progesteron

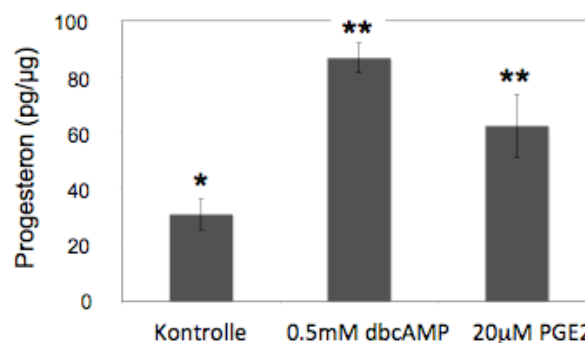


Abb. 5.4: Kanine primäre Luteinzellkultur: Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle steigt nach einer Stimulation mit PGE₂ oder cAMP die Expression des StAR-Gens und -Proteins, wie auch die Steroidhormonsynthese.

A) StAR-Expression in der Real Time (TaqMan) PCR, normalisiert gegen GAPDH und 18SrRNA. (*) unbehandelte Kontrolle, () gibt $p < 0,01$ an. (***) gibt $p < 0,05$ an.**

B) Western Blot: Die Expression von StAR sowohl nach der Behandlung mit dbcAMP als auch mit PGE₂ im Vergleich zur Kontrolle war mit $p < 0,01$ () signifikant erhöht.**

C) Radioimmunoassay: Die Progesteronkonzentration (pg/µg) im gesammelten Kulturmedium war nach der Behandlung mit dbcAMP oder PGE₂ zur Kontrolle signifikant erhöht (Säulen mit unterschiedlichen Sternen (*) und **) unterscheiden sich mit $p < 0,05$)

5.5 Expression des Prostaglandintransporter im Corpus luteum cyclicum und graviditatis

5.5.1 *RealTime(TaqMan)PCR*

In der semi-quantitativen RealTime(TaqMan)PCR konnte eine zeitabhängige Expression des kaninen Prostaglandintransporters (PGT) sowohl im Gelbkörper der trächtigen als auch der nicht trächtigen Hündin beobachtet werden (trächtige Hündin $p=0,005$, nicht trächtige Hündin $p<0,0001$). In nicht trächtigen Tieren wurde die höchste Expression in der frühen Gelbkörperphase an den Tagen 5, 15 und 25 p.o. festgestellt, anschliessend konnte ein signifikanter Abfall ($p<0,05$) bis zum Ende des Diöstrus gezeigt werden, welcher sich in einer 3,7-fachen Downregulation der Expression äusserte (Abb. 5.5.1A). Ein ähnliches Bild zeigte sich im Cl der trächtigen Hündin. Die höchste Expression fand zu Beginn der Gelbkörperphase statt, ein signifikanter Abfall konnte während der Phase der mittleren Trächtigkeit beobachtet werden ($p=0,005$). Während der präpartalen Luteolyse konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (Abb. 5.5.1B).

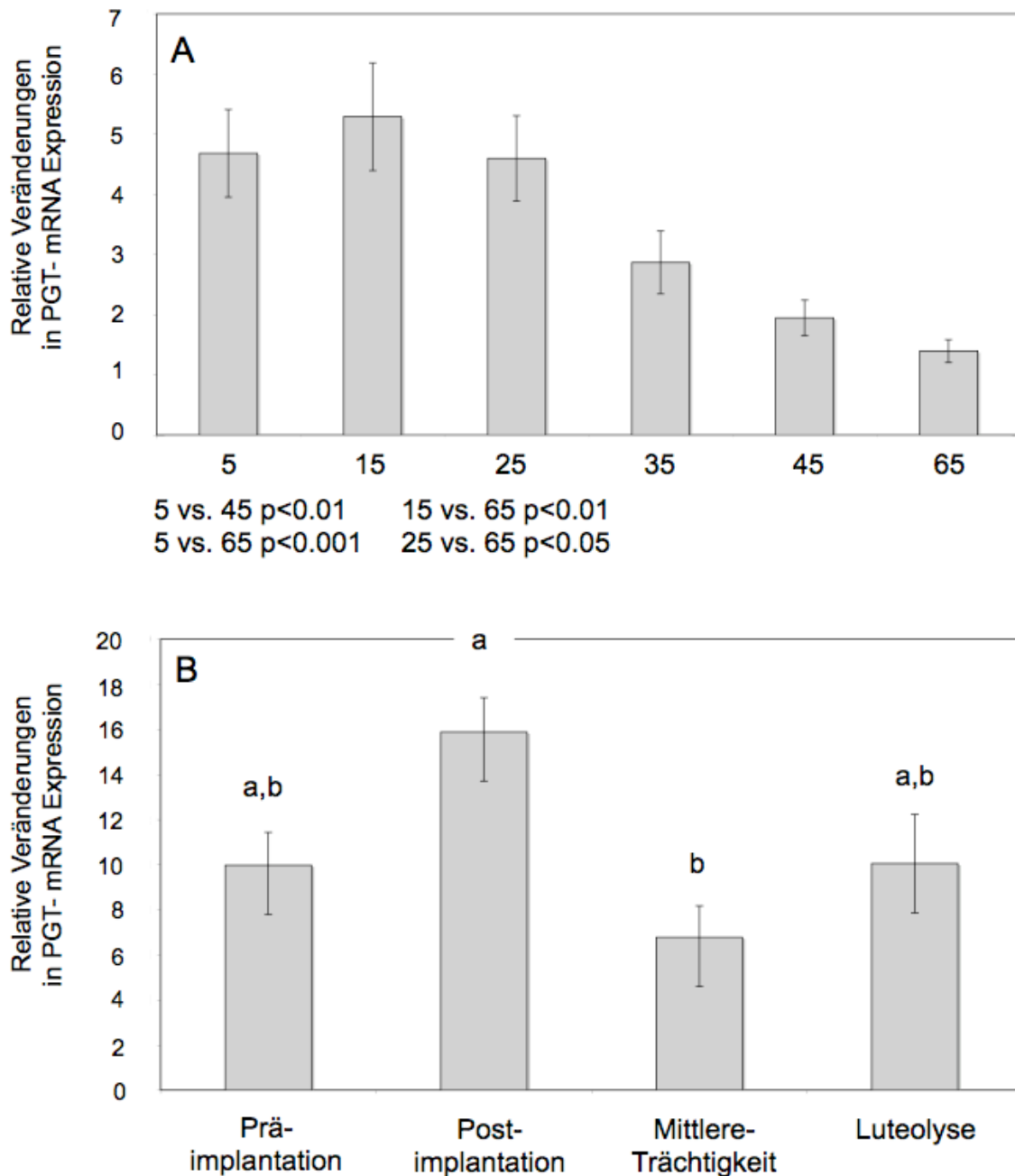


Abb. 5.5.1: Die Expression des kaninen Prostaglandintransporters (PGT) zu verschiedenen Zeitpunkten wurde mittels RealTime(TaqMan)PCR ermittelt:

A) Corpus luteum der zyklischen Hündin Die Expression des PGT wird von Tag 5- 65 post ovulationem dargestellt. Die Ergebnisse eines Tukey-Kramer Multiple Comparison Test sind unterhalb des Diagramms dargestellt.

B) Corpus luteum der trächtigen Hündin während der Trächtigkeit. Die Expression des PGT wird zu vier Zeitpunkten dargestellt: Präimplantation, Postimplantation, mittlere Trächtigkeit und präpartale Luteolyse. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich mit $p < 0,01$.

5.5.2 Immunhistochemische Darstellung des PGT im Corpus luteum

Das Muster der in der Realtime(TaqMan)PCR erhaltenen Expression der mRNA des PGT spiegelt sich auf der mittels Immunhistochemie dargestellten Proteinebene wider. Während der PGT in allen Phasen sowohl des Zyklus als auch der Trächtigkeit dargestellt werden konnte, wurden die stärksten Signale in der frühen Gelbkörperphase beobachtet. Die Expression des PGT beschränkte sich hierbei vorrangig auf die Lutealzellen, wobei einige schwache Signale in den Blutgefäßen auffindbar waren. Diese waren während der gesamten Gelbkörperphase darstellbar, es ist jedoch nicht eindeutig feststellbar, ob es sich hierbei um schwache Signale aufgrund einer niedrigen Expression oder um Hintergrundsignale handelt. Gezeigt werden repräsentative Bilder aus den Phasen der Postimplantation, mittleren Trächtigkeit und präpartalen Luteolyse (Abb. 5.5.2 A, B und C)

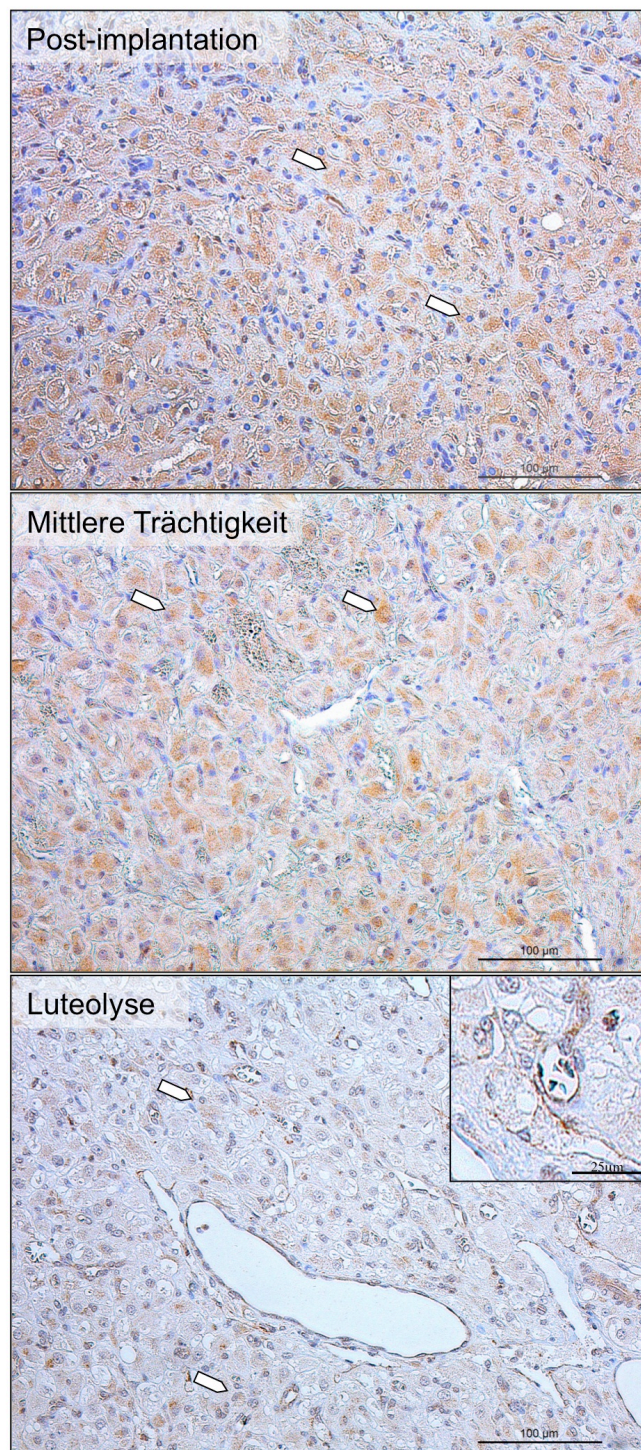


Abb.5.5.2: Lokalisation des PGT im kaninen CI mittels immunhistochemischer Färbung. Spezifische Signale sind hauptsächlich in den Luteinzellen lokalisiert (offene Pfeile), schwächere Signale können in den Gefäßen des Gelbkörpers festgestellt werden.

- A) Post-implantation**
- B) Mittlere Trächtigkeit**
- C) Präpartale Luteolyse**

6 Diskussion

Der Hund zeichnet sich bezüglich der Vorgänge im Fortpflanzungsgeschehen durch zahlreiche Besonderheiten aus.

Beispielsweise weist beim Hund im Kontrast zu anderen Spezies, die frühe Gelbkörperphase sowohl beim trächtigen als auch nicht trächtigen Tier eine Unabhängigkeit von hypophysären Einflüssen auf (Concannon, 1980). Da beim Hund das Corpus luteum die einzige Progesteronquelle ist (Concannon et al., 1989; Nishiyama et al., 1999), gilt den Regulationsmechanismen dieser Drüse, besonders in der gonadotropinunabhängigen Phase, spezielles Interesse.

Für zahlreiche Spezies wurden autoregulative Mechanismen der Gelbkörperfunktion nachgewiesen, wobei neben den Steroidhormonen ((Bah et al., 2006; Endo et al., 1998; Kowalewski et al., 2009)) und Faktoren des Immunsystems ((Arici et al., 1996; Pate, 1995; Wuttke et al., 1998)) insbesondere lokal produzierten Prostaglandinen wichtige Funktionen zuzukommen scheinen (Arosh et al., 2004; Diaz et al., 2002; Wiltbank and Ottobre, 2003). Obwohl auto- und parakrine Mechanismen auch zum Zeitpunkt der Luteolyse zum Tragen kommen, gilt das Hauptinteresse in der vorliegenden Arbeit den Vorgängen während der Gelbkörperanbildung. Vor allem PGE₂ scheint einer der bedeutendsten steroidogenen Faktoren in der autokrinen Regulation der Gelbkörperfunktion zu sein. Die luteotrope Wirkung von PGE₂ wurde unter anderem bei Mensch (Marsh and LeMaire, 1974), Kaninchen (Boiti et al., 2001), Schaf (Weems et al., 1997) und Rind (Arosh et al., 2004) nachgewiesen. PGE₂ wird durch die PGE-Synthase aus PGH₂ gebildet, wobei die Cyclooxygenase ein wichtiges Enzym für die Synthese der Vorläufermoleküle darstellt. Seine Wirkung übt PGE₂ über die Rezeptoren EP1-4 aus, wobei gezeigt wurde, dass im Reproduktionstrakt des Hundes vorrangig EP2 und EP4 exprimiert werden (Kowalewski et al., 2008a). Da EP4 auf mRNA-Ebene im Cl jedoch kein zyklusspezifisches Expressionsmuster aufweist, wurde angenommen, dass die luteotrope Wirkung von PGE₂ hauptsächlich über EP2 vermittelt wird (Kowalewski et al., 2009; Kowalewski et al., 2008a). Aufgrund der Koloalisation der PGE₂-Synthase und der PGE₂-Rezeptoren EP2 und EP4 in den kaninen Lutealzellen kann davon ausgegangen werden, dass PGE₂ auch beim Hund ein auto- und parakrin wirkender Faktor ist (Kowalewski et al., 2008a). Das Expressionsmuster von COX2, PGES und EP2 und EP4 gibt starke Anhaltspunkte dafür, dass dem PGE₂ vor allem in der frühen gonadotropinunabhängigen Gelbkörperphase eine grundsätzliche Rolle zukommt (Kowalewski et al., 2009).

Dennoch lagen bisher keine eindeutigen Daten zur luteotropen Wirkung von PGE₂ beim Hund vor. Durch die erfolgreiche Etablierung einer kaninen Lutealzellkultur gelang es in der vorliegenden Studie erstmals, die steroidogene Antwort der Zellen auf eine Stimulation mit PGE₂ nachzuweisen. Bisherige Versuche, kanine Lutealzellen zu kultivieren, gelangen nur bei Gelbkörpern, welche bis Tag 10 p.o. gewonnen wurden, auch konnte keine steroidogene Responsivität der Zellen gezeigt werden (Sonnack, 2009). Unsere Versuche zeigen, dass die Proliferation der Zellen und eine erfolgreiche Stimulation bis zirka Tag 21 p.o. möglich ist. Eine Isolation von Zellen in einem späteren Stadium (Tag 25 bis 65 p.o.) resultierte in einer verringerten Kultivierbarkeit und einer schwachen Reaktion auf die Stimulation mit trophischen Substanzen. Dies deckt sich mit den von Sonnack (2009) beschriebenen Beobachtungen (Sonnack, 2009).

Die steroidogenen Eigenschaften der isolierten Zellen wurden durch die Darstellung von StAR und 3βHSD im Zytoplasma mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. StAR und 3βHSD sind zusammen mit P450scc wichtige Faktoren der Progesteronbiosynthese (Übersicht bei (Niswender et al., 2000)). Während 3βHSD und P450scc enzymatisch aktiv sind, dient StAR dem Transport des Cholesterols über die Mitochondrienmembranen und somit der Substratbereitstellung am Syntheseort des Progesteronvorläufers Pregnenolon. Dieser Transportmechanismus ist der limitierende Schritt in der Steroidhormonbiosynthese, da Cholesterol nur durch StAR ins Mitochondrium gelangen kann (Stocco and Clark, 1996b). Somit kann über die Expression von StAR die Syntheserate von Progesteron entscheidend gesteuert werden.

StAR wird über den cAMP/PKA-Pfad aktiviert, wobei der Expressionsteigerung stets die Aktivierung der Promotorregion des StAR-Gens vorausgeht.

Der StAR-Promotor umfasst insgesamt einen Bereich von 3,6 kb. Durch Deletionsstudien und zielgerichtete Mutation einzelner Bereiche wurde jedoch bei verschiedenen Spezies gezeigt, dass das Fragment -150/-1 bp in seiner Aktivität der vollständigen Promotorregion äquivalent ist und zahlreiche Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren beherbergt (Übersicht bei (Manna et al., 2003)). Da die proximale Promotorregion durch eine starke Konservierung eine hohe Sequenzhomologie zwischen verschiedenen Spezies aufweist (Manna et al., 2003; Reinhart et al., 1999), ist die Durchführung eines Sequenzvergleichs möglich. Durch den Homologievergleich der Sequenz des murinen StAR-Promotors mit dem kaninen Genom wurde in dieser Studie erstmals die Sequenz des kaninen StAR-Promotors in einem Bereich von -255/-1 bp ermittelt. Mehrere wahrscheinliche Bindungsstellen für

Transkriptionsfaktoren wie SF-1, AP-1, C/EBP, YY-1 und DAX-1 wurden in diesem Bereich dargestellt. Diese Transkriptionsfaktoren wirken entweder aktivierend oder hemmend auf die StAR-Promotorregion und können somit als Enhancer oder Silencer angesprochen werden.

Wie bereits erwähnt ist die durch trophische Hormone induzierte StAR-Expression hauptsächlich cAMP-vermittelt, welches durch die Adenylatzyklase aus ATP synthetisiert wird. cAMP aktiviert die Proteinkinase A, welche durch eine Phosphorylierung der verschiedenen Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung des StAR-Promotors und somit Expression des StAR-Proteins führt (Manna et al., 2003; Stocco and Clark, 1996a). Um biologisch aktiv zu sein, muss das neu synthetisierte StAR-Protein posttranslational ebenfalls phosphoryliert werden (Stocco and Clark, 1996b). Während die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren durch die PKA Typ I stattfindet, wird StAR durch die PKA Typ II phosphoryliert und somit aktiviert (Dyson et al., 2009). Die Interaktion von cAMP auf cAMP-responsive Gene ist ein weit verbreiteter Signaltransduktionsweg, welcher häufig über die Aktivierung sogenannter cAMP-responsiver Elemente (CRE) induziert wird. Wie für das murine Genom konnten beim Hund jedoch keine vollständigen CRE identifiziert werden. Allerdings gelang es, neben den oben beschriebenen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, zwei Bereiche anzusprechen, welche "5'-CRE half-sites" darstellen und den bereits bekannten CRE-1 und CRE-2 der Maus entsprechen (Manna et al., 2002a).

Im Promotorassay wurde die Funktionalität des sequenzierten Promotors nachgewiesen und gezeigt, dass eine Aktivitätssteigerung nach einer Stimulation mit PGE₂ stattfindet. Der beobachtete Anstieg der Promotoraktivität war signifikant im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und entsprach in etwa der Aktivitätssteigerung nach der Behandlung mit cAMP.

Sowohl im Promotorassay als auch in den Stimulationsversuchen der primären Luteinzellen fand stets die Behandlung mit cAMP als Positivkontrolle statt.

Mittels RealTime(TaqMan)PCR und Western Blot wurde sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene bestätigt, dass durch die Stimulation mit PGE₂ eine signifikante Expressionssteigerung des StAR-Proteins stattfindet. Auch die Freisetzung von P4 ins Kulturmedium der stimulierten Lutealzellen wurde durch die Behandlung mit PGE₂ signifikant gesteigert und zeigt die erhöhte steroidogene Antwort der Zellen auf eine Aktivierung des StAR-Promotors.

Obwohl in Studien gezeigt wurde, dass in der frühen Lutealphase die Expression von 3βHSD gleichsam wie jene von StAR signifikant erhöht ist (Kowalewski et al., 2009; Kowalewski et al., 2006a), wurde in vorliegender Studie sowohl in der Realtime(TaqMan)PCR als auch im

Western Blot nach der Stimulation mit PGE₂ keine gesteigerte Expression von 3βHSD nachgewiesen. Gleiches gilt für das Enzym P450_{scc}. Somit ist eindeutig feststellbar, dass PGE₂ ein wichtiger luteotroper Faktor ist, welcher über die Aktivitätssteigerung des StAR-Promotors und eine verstärkte Expression des StAR-Proteins zur Zunahme der Steroidogenese führt, jedoch nicht zu einer gesteigerten Enzymexpression oder –aktivität bei 3βHSD oder P450_{scc} führt. Die Regulation der Steroidogenese in der frühen Lutealphase scheint somit über die variable Bereitstellung von Substrat stattzufinden, nicht aber durch einen gesteigerten Substratumsatz.

Während die bedeutende Rolle von PGE₂ in der frühen Lutealphase aufgrund unserer Beobachtungen kaum bestreitbar ist, ist unklar, welche Rolle es in der späten Gelbkörperphase einnimmt. Ab dem zweiten Drittel der Trächtigkeit wird Prolaktin essentiell für Erhalt des Gelbkörpers, das Cl wird somit abhängig von hypophysären Hormonen. Dass PGE₂ in dieser Phase seine Bedeutung verliert, lässt sich aufgrund der in dieser Studie gemachten Beobachtungen vermuten, nach denen Lutealzellen ab zirka Tag 21 p.o. nicht mehr auf die Stimulation mit trophischen Substanzen reagieren. Diese Aussage deckt sich mit dem Expressionsmuster von COX2 und PGES, welche in den Phasen der Postimplantation, mittleren Trächtigkeit und zum Zeitpunkt der präpartalen Luteolyse signifikant herabreguliert sind (Kowalewski et al., 2009). Auch die Expression von EP2 im Diöstrus der Hündin mit der höchsten Rezeptordichte in der frühen Gelbkörperphase (Kowalewski et al., 2008a), untermauert die Annahme, dass PGE₂ eine wichtige Rolle in der frühen Gelbkörperphase spielt und seine Bedeutung anschliessend verliert.

In Untersuchungen, welche von unserer Gruppe parallel zur Abfassung dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde eine interessante Beobachtung gemacht, welche ein neues Licht auf die Bedeutung von PGE₂ auch in der späten Gelbkörperphase wirft. Auf Proteinebene wurde gezeigt, dass EP2 im Cl der trächtigen Hündin in den Phasen der Prä- und Postimplantation und der mittleren Trächtigkeit konstant hoch exprimiert wird. EP4 erfährt nach einer verhältnismässig niedrigen Expression in den Phasen der Prä- und Postimplantation überraschenderweise eine signifikante Aufregulation in der Phase der mittleren Trächtigkeit. Sowohl EP2 als auch EP4 sind in der Phase der präpartalen Luteolyse herabreguliert. Somit weisen beide Rezeptoren ein streng zeitabhängiges Expressionsmuster auf, welches vermuten lässt, dass PGE₂ auch zu späteren Zeitpunkten in die auto- und parakrine Regulation der Gelbkörperfunktion involviert sein könnte. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Rolle des PGE₂ in der späten Gelbkörperphase zu klären.

Um die wichtige Rolle der Prostaglandine im Fortpflanzungsgeschehen weiter zu erleuchten und weitere Regulationsmechanismen der lokalen Prostaglandinwirkung zu klären, wurde in der vorliegenden Studie die Expression von PGT untersucht. Der PGT ermöglicht den Transport von Prostaglandinen über die Zellmembran, wobei sowohl der Efflux neu synthetisierter Prostaglandine aus der Zelle als auch der Influx von Prostaglandinen in den Intrazellulärraum möglich sind (Schuster, 1998). Der PGT wurde in zahlreichen Geweben des Organismus nachgewiesen, wobei eine hohe Expression besonders in Geweben auftritt, welche eine hohe Syntheseleistung für Prostaglandine haben (Bao et al., 2002). Auch wurde der PGT im Reproduktionstrakt nachgewiesen, so beispielsweise im Uterus und in den Ovarien des Menschen (Lu et al., 1996). Auch Banu et al. (2003) stellten die Bedeutung des PGT für die Modulation sowohl endokriner aber auch auto- und parakriner Mechanismen in Uterus und Ovarien bzw. Cl des Rindes deutlich dar (Banu et al., 2003), indem sie die hohe Expression des Transporters in den genannten Organen zeigten. In der vorliegenden Arbeit konnte der PGT mittels Realtime(TaqMan)PCR sowohl auf RNA-Ebene als auch mittels Immunhistochemie auf Proteinebene im Cl der Hündin nachgewiesen werden. Interessanterweise spiegelt das beobachtete Expressionsmuster des PGT exakt jenes von COX2 und PGES wider. Bei der zyklischen Hündin wurde eine hohe Expression in der frühen Gelbkörperphase (Tag 5, 15 und 25 p.o.) mit einem anschliessenden signifikanten Abfall bis zum Ende des Diöstrus gezeigt. Entsprechend fand die höchste Expression des PGT im jungen Cl der trächtigen Hündin in den Phasen der Prä- und Postimplantation statt, mit einem signifikanten Abfall in der anschliessenden Phase der mittleren Trächtigkeit. Diese Beobachtungen geben starke Anhaltspunkte für eine Beteiligung des PGT an der Regulation prostaglandinvermittelter auto- und parakriner Vorgänge im Cl des Hundes.

Zusammenfassend verdeutlicht die vorliegende Arbeit die Bedeutung auto- und parakriner Mechanismen in der Regulation der Gelbkörperfunktion bei der Hündin. Es konnte gezeigt werden, dass PGE₂ ein wichtiger steroidogener Faktor der frühen Gelbkörperphase ist, welcher seine Wirkung durch die Expressionssteigerung des StAR-Proteins ausübt. Aufgrund gleichbleibender Expressionslevel von 3 β HSD und P450_{scc} wurde verdeutlicht, dass PGE₂ die Aktivierung der Translation von StAR induziert, sich aber nicht auf die Umwandlung von Cholesterol in Pregnenolon oder die Synthese von Progesteron aus letzterem auswirkt. Diese Beobachtungen, zusammen mit der dargestellten zeitabhängigen Expression des PGT im

kaninen Gelbkörpergewebe, weist eindeutig auf die wichtige Rolle hin, welche die Prostaglandine lokal am Ovar ausüben.

7 Literaturverzeichnis

- Abramovitz, M., Boie, Y., Nguyen, T., Rushmore, T.H., Bayne, M.A., Metters, K.M., Slipetz, D.M., Grygorczyk, R., 1994. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *J Biol Chem* 269, 2632-2636.
- Allen, W.R., Stewart, F., 2001. Equine placentation. *Reprod Fertil Dev* 13, 623-634.
- Allport, V.B., P., 2001. Cyclooxygenase enzymes and human labour. *Therapeutic Roles of Selective COX-2 Inhibitors* William Harvey Press, London, 252-273.
- Alvarez-Oxiley, A.V., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., 2008. Native and recombinant bovine placental lactogens. *Reprod Biol* 8, 85-106.
- Andersen, A., Simpson, M. E., 1973. The ovary and reproductive cycle of the dog (beagle). Geron-X. Inc, Los Altos, CA.
- Anderson, L.L., Rathmacher, R.P., Melampy, R.M., 1966. The uterus and unilateral regression of corpora lutea in the pig. *The American journal of physiology* 210, 611-614.
- Arakane, F., King, S.R., Du, Y., Kallen, C.B., Walsh, L.P., Watari, H., Stocco, D.M., Strauss, J.F., 3rd, 1997. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* 272, 32656-32662.
- Arici, A., Oral, E., Bukulmez, O., Buradagunta, S., Engin, O., Olive, D.L., 1996. Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells. *Endocrinology* 137, 3762-3769.
- Arosh, J.A., Banu, S.K., Chapdelaine, P., Emond, V., Kim, J.J., MacLaren, L.A., Fortier, M.A., 2003. Molecular cloning and characterization of bovine prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4: expression and regulation in endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 144, 3076-3091.
- Arosh, J.A., Banu, S.K., Chapdelaine, P., Madore, E., Sirois, J., Fortier, M.A., 2004. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology* 145, 2551-2560.

- Bah, M.M., Acosta, T.J., Pilawski, W., Deptula, K., Okuda, K., Skarzynski, D.J., 2006. Role of intraluteal prostaglandin F(2alpha), progesterone and oxytocin in basal and pulsatile progesterone release from developing bovine corpus luteum. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 79, 218-229.
- Banu, S.K., Arosh, J.A., Chapdelaine, P., Fortier, M.A., 2003. Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: a basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11747-11752.
- Bao, B., Garverick, H.A., 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal of animal science* 76, 1903-1921.
- Bao, Y., Pucci, M.L., Chan, B.S., Lu, R., Ito, S., Schuster, V.L., 2002. Prostaglandin transporter PGT is expressed in cell types that synthesize and release prostanoids. *American journal of physiology. Renal physiology* 282, F1103-1110.
- Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Floridia, G., Worley, K.C., Tonini, G., Ferrante, E., Chiumello, G., McCabe, E.R., Fraccaro, M., et al., 1994. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature genetics* 7, 497-501.
- Baulieu, E.E., 1989. Contragestion and other clinical applications of RU 486, an antiprogestosterone at the receptor. *Science* 245, 1351-1357.
- Bazer, F.W., Thatcher, W.W., 1977. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F2alpha by the uterine endometrium. *Prostaglandins* 14, 397-400.
- Boiti, C., Zampini, D., Zerani, M., Guelfi, G., Gobbetti, A., 2001. Prostaglandin receptors and role of G protein-activated pathways on corpora lutea of pseudopregnant rabbit in vitro. *J Endocrinol* 168, 141-151.
- Braunstein, G.D., Rasor, J., Danzer, H., Adler, D., Wade, M.E., 1976. Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 126, 678-681.
- Buhr, M.M., 1987. Effect of lipoproteins and luteinizing hormone on progesterone production by large and small luteal cells throughout the porcine estrous cycle. *Journal of animal science* 65, 1027-1033.

Bulmer, D., 1964. The Histochemistry of Ovarian Macrophages in the Rat. *J Anat* 98, 313-319.

Büsges, F., 2003. immunhistologischer Nachweis von Leukozyten, MHCII-Antigen und Gefäßendothelien am Corpus luteum der Hündin im Verlauf des Zyklus. Dissertation med. vet. Universität Giessen.

Caron, K.M., Ikeda, Y., Soo, S.C., Stocco, D.M., Parker, K.L., Clark, B.J., 1997a. Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 11, 138-147.

Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J., Parker, K.L., 1997b. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11540-11545.

Chan, B.S., Endo, S., Kanai, N., Schuster, V.L., 2002. Identification of lactate as a driving force for prostanoid transport by prostaglandin transporter PGT. *American journal of physiology. Renal physiology* 282, F1097-1102.

Chedrese, P.J., 2009. Reproductive Endocrinology. Springer Science and Business Media, New York 1. Auflage.

Christiansen, I.J., 1984. Reproduction in the cat and dog. Bailliere Tindall, London.

Clark, B.J., Wells, J., King, S.R., Stocco, D.M., 1994. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 269, 28314-28322.

Concannon, P.W., 1980. Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch. *J Reprod Fertil* 58, 407-410.

Concannon, P.W., 1993. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 47, 3-27.

Concannon, P.W., Castracane, V.W., Temple, M., Montanez, A., 2009. Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. *Animal Reproduction*, p. 172-193.

Concannon, P.W., Hansel, W., 1977. Prostaglandin F2alpha induced luteolysis, hypothermia, and abortions in beagle bitches. *Prostaglandins* 13, 533-542.

Concannon, P.W., Hansel, W., McEntee, K., 1977. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod* 17, 604-613.

Concannon, P.W., Hansel, W., Visek, W.J., 1975. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol Reprod* 13, 112-121.

Concannon, P.W., Isaman, L., Frank, D.A., Michel, F.J., Currie, W.B., 1988. Elevated concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F-2 alpha in maternal plasma during prepartum luteolysis and parturition in dogs (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* 84, 71-77.

Concannon, P.W., McCann, J.P., Temple, M., 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 39, 3-25.

Concannon, P.W., Weinstein, P., Whaley, S., Frank, D., 1987. Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine. *J Reprod Fertil* 81, 175-180.

Cook, B., Kaltenbach, C.C., Norton, H.W., Nalbandov, A.V., 1967. Synthesis of progesterone in vitro by porcine corpora lutea. *Endocrinology* 81, 573-584.

Diaz, F.J., Anderson, L.E., Wu, Y.L., Rabot, A., Tsai, S.J., Wiltbank, M.C., 2002. Regulation of progesterone and prostaglandin F2alpha production in the CL. *Mol Cell Endocrinol* 191, 65-80.

Dyson, M.T., Kowalewski, M.P., Manna, P.R., Stocco, D.M., 2009. The differential regulation of steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis by type I and type II PKA in MA-10 cells. *Mol Cell Endocrinol* 300, 94-103.

Endo, T., Henmi, H., Goto, T., Kitajima, Y., Kiya, T., Nishikawa, A., Manase, K., Yamamoto, H., Kudo, R., 1998. Effects of estradiol and an aromatase inhibitor on progesterone production in human cultured luteal cells. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 12, 29-34.

Engel, E., Klein, R., Baumgartner, W., Hoffmann, B., 2005. Investigations on the expression of cytokines in the canine corpus luteum in relation to dioestrus. *Animal reproduction science* 87, 163-176.

Feldman, D.L., Nelson, R.W., 1987. Canine and feline endocrinology and reproduction. *Canine and feline reproduction*, 399-480.

Fernandes, P.A., Bowen, R.A., Kostas, A.C., Sawyer, H.R., Nett, T.M., Olson, P.N., 1987. Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration of and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin. *Biol Reprod* 37, 804-811.

Ferreira-Dias, G., Costa, A.S., Mateus, L., Korzekwa, A., Redmer, D.A., Skarzynski, D.J., 2006. Proliferative processes within the equine corpus luteum may depend on paracrine progesterone actions. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 57 Suppl 8, 139-151.

Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G., 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80, 1523-1631.

Gibori, G., Keyes, P.L., 1978. Role of intraluteal estrogen in the regulation of the rat corpus luteum during pregnancy. *Endocrinology* 102, 1176-1182.

Graf, K.J., 1978. Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. *J Reprod Fertil* 52, 9-14.

Hamberg, M., Svensson, J., Samuelsson, B., 1974. Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3824-3828.

Hashii, K., Fujiwara, H., Yoshioka, S., Kataoka, N., Yamada, S., Hirano, T., Mori, T., Fujii, S., Maeda, M., 1998. Peripheral blood mononuclear cells stimulate progesterone production by luteal cells derived from pregnant and non-pregnant women: possible involvement of interleukin-4 and interleukin-10 in corpus luteum function and differentiation. *Human reproduction* 13, 2738-2744.

Hay, D.L., Lopata, A., 1988. Chorionic gonadotropin secretion by human embryos in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 67, 1322-1324.

Heap, R.B., Perry, J.S., Rowlands, I.W., 1967. Corpus luteum function in the guinea-pig; arterial and luteal progesterone levels, and the effects of hysterectomy and hypophysectomy. *J Reprod Fertil* 13, 537-553.

Herschman, H.R., 1996. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1299, 125-140.

Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N., Wagner, E.F., 1993. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 365, 179-181.

Hoffmann, B., 1990. Gravidität, Geburt und Puerperium. Döcke, F., Veterinärmedizinische Endokrinologie, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.

Hoffmann, B., Busges, F., Engel, E., Kowalewski, M.P., Papa, P., 2004. Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 39, 232-240.

Hoffmann, B., Hoveler, R., Hasan, S.H., Failing, K., 1992. Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. *J Reprod Fertil* 96, 837-845.

Hoffmann, B., Schneider, S., 1993. Secretion and release of luteinizing hormone during the luteal phase of the oestrous cycle in the dog. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 47, 85-91.

Holt, J.A., 1989. Regulation of progesterone production in the rabbit corpus luteum. *Biol Reprod* 40, 201-208.

Hoppen, H.O., 1994. The equine placenta and equine chorionic gonadotrophin--an overview. *Exp Clin Endocrinol* 102, 235-243.

Hughes, E.G., Kelly, A.J., Kavanagh, J., 2001. Dinoprostone vaginal insert for cervical ripening and labor induction: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 97, 847-855.

Hunter, T., Karin, M., 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70, 375-387.

Jameson, J.L., Hollenberg, A.N., 1993. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr Rev* 14, 203-221.

Jo, Y., King, S.R., Khan, S.A., Stocco, D.M., 2005. Involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent kinase in steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid biosynthesis in Leydig cells. *Biol Reprod* 73, 244-255.

Jones, G.E., Boyns, A.R., Cameron, E.H., Bell, E.T., Christie, D.W., Parkes, M.F., 1973. Plasma oestradiol, luteinizing hormone and progesterone during pregnancy in the Beagle bitch. *J Reprod Fertil* 35, 187-189.

Kanai, N., Lu, R., Satriano, J.A., Bao, Y., Wolkoff, A.W., Schuster, V.L., 1995. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 268, 866-869.

Katsumara, N.T., Ayako; Sato, Naoko; Horikawa, Reiko; Tanaka, Toshiaki, 2000. Adrenal gland. Significance of new StAR gene mutation of S195A-StAR phosphorylation found in congenital adrenal lipoid hyperplasia. *Clinical Endocrinology*.

Kennedy, C.R., Zhang, Y., Brandon, S., Guan, Y., Coffee, K., Funk, C.D., Magnuson, M.A., Oates, J.A., Breyer, M.D., Breyer, R.M., 1999. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nature medicine* 5, 217-220.

Kowalewski, M.P., Beceriklisoy, H.B., Aslan, S., Agaoglu, A.R., Hoffmann, B., 2009. Time related changes in luteal prostaglandin synthesis and steroidogenic capacity during pregnancy, normal and antiprogesterone induced luteolysis in the bitch. *Animal reproduction science* 116, 129-138.

Kowalewski, M.P., Beceriklisoy, H.B., Pfarrer, C., Aslan, S., Kindahl, H., Kucukaslan, I., Hoffmann, B., 2010. Canine placenta: a source of prepartal prostaglandins during normal and antiprogesterone-induced parturition. *Reproduction* 139, 655-664.

Kowalewski, M.P., Hoffmann, B., 2008. Molecular cloning and expression of StAR protein in the canine corpus luteum during dioestrus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116, 158-161.

Kowalewski, M.P., Mason, J.I., Howie, A.F., Morley, S.D., Schuler, G., Hoffmann, B., 2006a. Characterization of the canine 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and its expression in the corpus luteum during diestrus. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 101, 254-262.

Kowalewski, M.P., Michel, E., Gram, A., Boos, A., Guscetti, F., Hoffmann, B., Aslan, S., Reichler, I., 2011. Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 109.

Kowalewski, M.P., Mutembei, H.M., Hoffmann, B., 2008a. Canine prostaglandin E2 synthase (PGES) and its receptors (EP2 and EP4): expression in the corpus luteum during dioestrus. *Animal reproduction science* 109, 319-329.

Kowalewski, M.P., Mutembei, H.M., Hoffmann, B., 2008b. Canine prostaglandin F2 α receptor (FP) and prostaglandin F2 α synthase (PGFS): molecular cloning and expression in the corpus luteum. *Animal reproduction science* 107, 161-175.

Kowalewski, M.P., Schuler, G., Taubert, A., Engel, E., Hoffmann, B., 2006b. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. *Theriogenology* 66, 1423-1430.

Krisans, S.K., 1996. Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 804, 142-164.

Lalli, E., Melner, M.H., Stocco, D.M., Sassone-Corsi, P., 1998. DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. *Endocrinology* 139, 4237-4243.

Lehninger, A.L., 2002. *Principles of Biochemistry*. Worth, New York.

Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J.F., 3rd, Clark, B.J., Stocco, D.M., Saenger, P., Rogol, A., Miller, W.L., 1995. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 267, 1828-1831.

Liu, Q., Merkler, K.A., Zhang, X., McLean, M.P., 2007. Prostaglandin F2 α suppresses rat steroidogenic acute regulatory protein expression via induction of Yin Yang 1 protein and recruitment of histone deacetylase 1 protein. *Endocrinology* 148, 5209-5219.

Lorence, M.C., Murry, B.A., Trant, J.M., Mason, J.I., 1990. Human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase from placenta: expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/isomerization of C21 and C19 steroids. *Endocrinology* 126, 2493-2498.

Lu, R., Kanai, N., Bao, Y., Schuster, V.L., 1996. Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT). *J Clin Invest* 98, 1142-1149.

Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Jr., Shyamala, G., Conneely, O.M., O'Malley, B.W., 1995. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & development* 9, 2266-2278.

Madore, E., Harvey, N., Parent, J., Chapdelaine, P., Arosh, J.A., Fortier, M.A., 2003. An aldose reductase with 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f2 α in the bovine endometrium. *J Biol Chem* 278, 11205-11212.

Magness, R.R., Huie, J.M., Hoyer, G.L., Huecksteadt, T.P., Reynolds, L.P., Seperich, G.J., Whysong, G., Weems, C.W., 1981. Effect of chronic ipsilateral or contralateral intrauterine

infusion of prostaglandin E2 (PGE2) on luteal function of unilaterally ovariectomized ewes. *Prostaglandins and medicine* 6, 389-401.

Mamluk, R., Chen, D., Greber, Y., Davis, J.S., Meidan, R., 1998. Characterization of messenger ribonucleic acid expression for prostaglandin F2 alpha and luteinizing hormone receptors in various bovine luteal cell types. *Biol Reprod* 58, 849-856.

Manna, P.R., Dyson, M.T., Eubank, D.W., Clark, B.J., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Zeleznik, A.J., Stocco, D.M., 2002a. Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family. *Mol Endocrinol* 16, 184-199.

Manna, P.R., Dyson, M.T., Stocco, D.M., 2009. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 15, 321-333.

Manna, P.R., Eubank, D.W., Stocco, D.M., 2004. Assessment of the role of activator protein-1 on transcription of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene. *Mol Endocrinol* 18, 558-573.

Manna, P.R., Huhtaniemi, I.T., Wang, X.J., Eubank, D.W., Stocco, D.M., 2002b. Mechanisms of epidermal growth factor signaling: regulation of steroid biosynthesis and the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig tumor cells. *Biol Reprod* 67, 1393-1404.

Manna, P.R., Wang, X.J., Stocco, D.M., 2003. Involvement of multiple transcription factors in the regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *Steroids* 68, 1125-1134.

Marsh, J.M., LeMaire, W.J., 1974. Cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in the human corpus luteum: effect of gonadotropins and prostaglandins. *J Clin Endocrinol Metab* 38, 99-106.

Maslar, I.A., Powers-Craddock, P., Ansbacher, R., 1986. Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium: effects of continuous and intermittent progesterone treatment. *Biol Reprod* 34, 741-750.

McCracken, J.A., Glew, M.E., Scaramuzzi, R.J., 1970. Corpus luteum regression induced by prostagland in F2-alpha. *J Clin Endocrinol Metab* 30, 544-546.

- Miller, W.L., 1997. Congenital lipoid adrenal hyperplasia: the human gene knockout for the steroidogenic acute regulatory protein. *Journal of molecular endocrinology* 19, 227-240.
- Miller, W.L., 2007. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 1771, 663-676.
- Milvae, R.A., Hansel, W., 1983. Prostacyclin, prostaglandin F₂ alpha and progesterone production by bovine luteal cells during the estrous cycle. *Biol Reprod* 29, 1063-1068.
- Moore, N.W., Barrett, S., Brown, J.B., 1972. Progesterone concentrations in maternal and foetal blood plasma of ewes. *J Endocrinol* 53, 187-194.
- Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., Conneely, O.M., 2000. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289, 1751-1754.
- Muscatelli, F., Strom, T.M., Walker, A.P., Zanaria, E., Recan, D., Meindl, A., Bardoni, B., Guioli, S., Zehetner, G., Rabl, W., et al., 1994. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372, 672-676.
- Nackley, A.C., Shea-Eaton, W., Lopez, D., McLean, M.P., 2002. Repression of the steroidogenic acute regulatory gene by the multifunctional transcription factor Yin Yang 1. *Endocrinology* 143, 1085-1096.
- Nalbant, D., Williams, S.C., Stocco, D.M., Khan, S.A., 1998. Luteinizing hormone-dependent gene regulation in Leydig cells may be mediated by CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Endocrinology* 139, 272-279.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79, 1193-1226.
- Nelson, D., Cox, Michael, 2011. *Lehninger Biochemie*. Springer Science and Business Media, New York 4. Auflage.
- Nett, T.M., Akbar, A.M., Phemister, R.D., Holst, P.A., Reichert, L.E., Jr., niswender, G.D., 1975. Levels of lutenizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the estrous cycle and pregnancy in the beagle bitch (38491). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine 148, 134-139.

- Nguyen, M., Camenisch, T., Snouwaert, J.N., Hicks, E., Coffman, T.M., Anderson, P.A., Malouf, N.N., Koller, B.H., 1997. The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature* 390, 78-81.
- Nishiyama, T., Tsumagari, S., Ito, M., Kimura, J., Watanabe, G., Taya, K., Takeishi, M., 1999. Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. *Anatomia, histologia, embryologia* 28, 125-129.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W., 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80, 1-29.
- Noakes, D.E., Parkinson, T.J., 2009. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Saunders Elsevier. London 9.
- Nohr, B., Hoffmann, B., Steinetz, B.E., 1993. Investigation of the endocrine control of parturition in the dog by application of an antigestagen. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 47, 542-543.
- Okkens, A.C., Bevers, M.M., Dieleman, S.J., Willemse, A.H., 1990. Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. *The Veterinary quarterly* 12, 193-201.
- Okkens, A.C., Dieleman, S.J., Bevers, M.M., Lubberink, A.A., Willemse, A.H., 1986. Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. *J Reprod Fertil* 77, 187-192.
- Olofsson, J., Leung, P.C., 1994. Auto/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function. *Mol Cell Endocrinol* 100, 87-91.
- Olson, P.N., Bowen, R.A., Behrendt, M.D., Olson, J.D., Nett, T.M., 1984. Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy. *American journal of veterinary research* 45, 149-153.
- Onclin, K., Murphy, B., Verstegen, J.P., 2002. Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology* 57, 1957-1972.
- Onclin, K., Silva, L.D., Donnay, I., Verstegen, J.P., 1993. Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 47, 403-409.

Onclin, K., Verstegen, J.P., 1997. In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and -diestrus. *Domestic animal endocrinology* 14, 25-38.

Onclin, K., Verstegen, J.P., Concannon, P.W., 2000. Time-related changes in canine luteal regulation: in vivo effects of LH on progesterone and prolactin during pregnancy. *J Reprod Fertil* 118, 417-424.

Ottander, U., Hosokawa, K., Liu, K., Bergh, A., Ny, T., Olofsson, J.I., 2000. A putative stimulatory role of progesterone acting via progesterone receptors in the steroidogenic cells of the human corpus luteum. *Biol Reprod* 62, 655-663.

Papa, P.C., Hoffmann, B., 2011. The corpus luteum of the dog: source and target of steroid hormones? *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 46, 750-756.

Papa, P.d.C., 2001. Darstellung von Estradiol-17b- und Progesteronrezeptoren im Corpus luteum der Hündin zu definierten Zeitpunkten im Östrus und Diöstrus. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Parkington, H.C., 1983. Electrical properties of the costo-uterine muscle of the guinea-pig. *The Journal of physiology* 335, 15-27.

Pate, J.L., 1995. Involvement of immune cells in regulation of ovarian function. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 49, 365-377.

Pate, J.L., Toyokawa, K., Walusimbi, S., Brzezicka, E., 2010. The interface of the immune and reproductive systems in the ovary: lessons learned from the corpus luteum of domestic animal models. *Am J Reprod Immunol* 64, 275-286.

Patek, C.E., Watson, J., 1983. Factors affecting steroid and prostaglandin secretion by reproductive tissues of cycling and pregnant sows in vitro. *Biochim Biophys Acta* 755, 17-24.

Peters, K.E., Bergfeld, E.G., Cupp, A.S., Kojima, F.N., Mariscal, V., Sanchez, T., Wehrman, M.E., Grotjan, H.E., Hamernik, D.L., Kittok, R.J., et al., 1994. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. *Biol Reprod* 51, 1248-1254.

Phemister, R.D., Holst, P.A., Spano, J.S., Hopwood, M.L., 1973. Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol Reprod* 8, 74-82.

Piontkewitz, Y., Enerback, S., Hedin, L., 1996. Expression of CCAAT enhancer binding protein-alpha (C/EBP alpha) in the rat ovary: implications for follicular development and ovulation. *Developmental biology* 179, 288-296.

Pratt, B.R., Butcher, R.L., Inskeep, E.K., 1977. Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGE₂ in ewes. *Journal of animal science* 45, 784-791.

Pucci, M.L., Bao, Y., Chan, B., Itoh, S., Lu, R., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Schuster, V.L., 1999. Cloning of mouse prostaglandin transporter PGT cDNA: species-specific substrate affinities. *The American journal of physiology* 277, R734-741.

Rajkumar, K., Malinek, J., Murphy, B.D., 1985. Effect of lipoproteins and luteotrophins on progesterone accumulation by luteal cells from the pregnant pig. *Steroids* 45, 119-134.

Reinhart, A.J., Williams, S.C., Clark, B.J., Stocco, D.M., 1999. SF-1 (steroidogenic factor-1) and C/EBP beta (CCAAT/enhancer binding protein-beta) cooperate to regulate the murine StAR (steroidogenic acute regulatory) promoter. *Mol Endocrinol* 13, 729-741.

Reynolds, L.P., Killilea, S.D., Redmer, D.A., 1992. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6, 886-892.

Robinson, J.E., Healey, A.E., Harris, T.G., Messent, E.A., Skinner, D.C., Taylor, J.A., Evans, N.P., 2000. The negative feedback action of progesterone on luteinizing hormone release is not associated with changes in GnRH mRNA expression in the Ewe. *J Neuroendocrinol* 12, 121-129.

Romagnoli, S.E., Cela, M., Camillo, F., 1991. Use of prostaglandin F₂ alpha for early pregnancy termination in the mismated bitch. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 21, 487-499.

Roser, J.F., Evans, J.W., 1983. Luteal luteinizing hormone receptors during the postovulatory period in the mare. *Biol Reprod* 29, 499-510.

Sadovsky, Y., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Clements, M.A., Tourtellotte, L.M., Simburger, K., Milbrandt, J., 1995. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic

108

factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10939-10943.

Sakamoto, K., Ezashi, T., Miwa, K., Okuda-Ashitaka, E., Houtani, T., Sugimoto, T., Ito, S., Hayaishi, O., 1994. Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F2 alpha receptor. *J Biol Chem* 269, 3881-3886.

Sandhoff, T.W., Hales, D.B., Hales, K.H., McLean, M.P., 1998. Transcriptional regulation of the rat steroidogenic acute regulatory protein gene by steroidogenic factor 1. *Endocrinology* 139, 4820-4831.

Schnorr, B., Kressin, M., 2006. *Embryologie der Haustiere*. Enke.

Schuler, G., Greven, H., Kowalewski, M.P., Doring, B., Ozalp, G.R., Hoffmann, B., 2008. Placental steroids in cattle: hormones, placental growth factors or by-products of trophoblast giant cell differentiation? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116, 429-436.

Schuler, G., Teichmann, U., Kowalewski, M.P., Hoffmann, B., Madore, E., Fortier, M.A., Klisch, K., 2006. Expression of cyclooxygenase-II (COX-II) and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (20alpha-HSD)/prostaglandin F-synthase (PGFS) in bovine placentomes: implications for the initiation of parturition in cattle. *Placenta* 27, 1022-1029.

Schuster, V.L., 1998. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* 60, 221-242.

Shi, Y., Lee, J.S., Galvin, K.M., 1997. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim Biophys Acta* 1332, F49-66.

Siegenthaler, W., Blum, H., 2006. *Klinische Pathophysiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart 9. Auflage.

Silver, M., 1994. Placental progestagens in the sheep and horse and the changes leading to parturition. *Exp Clin Endocrinol* 102, 203-211.

Silverman, E., Eimerl, S., Orly, J., 1999. CCAAT enhancer-binding protein beta and GATA-4 binding regions within the promoter of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene are required for transcription in rat ovarian cells. *J Biol Chem* 274, 17987-17996.

Simmons, D.L., Botting, R.M., Hla, T., 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews* 56, 387-437.

Simpson, E.R., MacDonald, P.C., 1981. Endocrine physiology of the placenta. *Annu Rev Physiol* 43, 163-188.

Smith, W.L., Lands, W.E., 1972. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. *Biochemistry* 11, 3276-3285.

Soares, M.J., 2004. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 51.

Sonnack, M., 2009. Untersuchungen zur Bildung, Regression und Funktionalität des Corpus luteum der nicht graviden Hündin, morphologische und biochemische Aspekte. Diss. med. vet. Justus-Liebig-Universität Giessen, Deutschland.

Steinetz, B.G., Goldsmith, L.T., Hasan, S.H., Lust, G., 1990. Diurnal variation of serum progesterone, but not relaxin, prolactin, or estradiol-17 beta in the pregnant bitch. *Endocrinology* 127, 1057-1063.

Stocco, D.M., 2001. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 63, 193-213.

Stocco, D.M., Clark, B.J., 1996a. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 17, 221-244.

Stocco, D.M., Clark, B.J., 1996b. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochemical pharmacology* 51, 197-205.

Stocco, D.M., Sodeman, T.C., 1991. The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J Biol Chem* 266, 19731-19738.

Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y., Manna, P.R., 2005. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 19, 2647-2659.

Strinden, S.T., Shapiro, S.S., 1983. Progesterone-altered secretory proteins from cultured human endometrium. *Endocrinology* 112, 862-870.

Sugawara, T., Holt, J.A., Kiriakidou, M., Strauss, J.F., 3rd, 1996. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry* 35, 9052-9059.

Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Segi, E., Tsuboi, K., Aze, Y., Nishimura, T., Oida, H., Yoshida, N., Tanaka, T., Katsuyama, M., Hasumoto, K., Murata, T., Hirata, M., Ushikubi, F., Negishi, M., Ichikawa, A., Narumiya, S., 1997. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* 277, 681-683.

Sun, H.S., Hsiao, K.Y., Hsu, C.C., Wu, M.H., Tsai, S.J., 2003. Transactivation of steroidogenic acute regulatory protein in human endometriotic stromal cells is mediated by the prostaglandin EP2 receptor. *Endocrinology* 144, 3934-3942.

Tibbetts, T.A., Conneely, O.M., O'Malley, B.W., 1999. Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. *Biol Reprod* 60, 1158-1165.

Tilley, S.L., Audoly, L.P., Hicks, E.H., Kim, H.S., Flannery, P.J., Coffman, T.M., Koller, B.H., 1999. Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J Clin Invest* 103, 1539-1545.

Tuckey, R.C., Atkinson, H.C., 1989. Pregnenolone synthesis from cholesterol and hydroxycholesterols by mitochondria from ovaries following the stimulation of immature rats with pregnant mare's serum gonadotropin and human choriogonadotropin. *Eur J Biochem* 186, 255-259.

Tulchinsky, D., Hobel, C.J., 1973. Plasma human chorionic gonadotropin, estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. 3. Early normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 117, 884-893.

Vermeirsch, H., Simoens, P., Lauwers, H., 2000. Immunohistochemical detection of the estrogen receptor-alpha and progesterone receptor in the canine pregnant uterus and placental labyrinth. *Anat Rec* 260, 42-50.

Verstegen-Onclin, K., Verstegen, J., 2008. Endocrinology of pregnancy in the dog: a review. *Theriogenology* 70, 291-299.

Vijayakumar, R., Walters, W.A., 1983. Human luteal tissue prostaglandins, 17 beta-estradiol, and progesterone in relation to the growth and senescence of the corpus luteum. *Fertility and sterility* 39, 298-303.

Watts, J.R., Wright, P.J., Parry, B.W., 2001. Sodium cloprostenol administered at a continuous low dosage induces polydipsia and suppresses luteal function in early dioestrous bitches. *Animal reproduction science* 67, 113-123.

Weems, Y.S., Bridges, P.J., Tanaka, Y., Sasser, R.G., LeaMaster, B.R., Vincent, D.L., Weems, C.W., 1997. PGE1 or PGE2 not LH regulates secretion of progesterone in vitro by the 88-90 day ovine corpus luteum of pregnancy. *Prostaglandins* 53, 337-353.

Williams, B.J., Watts, J.R., Wright, P.J., Shaw, G., Renfree, M.B., 1999. Effect of sodium cloprostenol and flunixin meglumine on luteolysis and the timing of birth in bitches. *J Reprod Fertil* 116, 103-111.

Wiltbank, M.C., Belfiore, C.J., Niswender, G.D., 1993. Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells. *Mol Cell Endocrinol* 97, 1-7.

Wiltbank, M.C., Ottobre, J.S., 2003. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 91.

Wiltbank, M.C., Niswender, G. D., 1956. Alteration of ovarian activity by hysterectomy. *Journal of Animal Sciences*

.

Wooton-Kee, C.R., Clark, B.J., 2000. Steroidogenic factor-1 influences protein-deoxyribonucleic acid interactions within the cyclic adenosine 3,5-monophosphate-responsive regions of the murine steroidogenic acute regulatory protein gene. *Endocrinology* 141, 1345-1355.

Wulff, C., Wilson, H., Largue, P., Duncan, W.C., Armstrong, D.G., Fraser, H.M., 2000. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4302-4309.

Wuttke, W., Spiess, S., Knoke, I., Pitzel, L., Leonhardt, S., Jarry, H., 1998. Synergistic effects of prostaglandin F2alpha and tumor necrosis factor to induce luteolysis in the pig. Biol Reprod 58, 1310-1315.

8 Anhang

8.1 Puffer und Lösungen

Formaldehyd 4%, gepuffert, pH 7,0, für die Gewebefixierung (Formol nach Lillie)

Formol (40% Formaldehydlösung)	500 ml
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	20 g
Na_2HPO_4	32,5 g
Steriles Aqua bidest.	Ad 500 ml

Phosphatpuffer für die Aufbewahrung von Gewebeproben nach Formalin-Fixierung

Lösung 1:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	13,8 g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

Lösung 2:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	17,8 g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

Gebrauchslösung:

Lösung 1	14,15 ml
Lösung 2	35,85 ml

TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) 10x

Tris	108 g
Borsäure	55 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	40 ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

Gebrauchslösung 1x

0,5 M EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat)

EDTA	37,22 g
Steriles bidest. Wasser	160 ml

Um EDTA zu lösen auf pH=8,0 einstellen, anschließend mit sterilem bidest. Wasser ad 200 ml auffüllen.

PBS (Phosphat buffered saline) 10 x

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
NaH ₂ PO ₄	2,4 g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

PBS (Phosphat buffered saline) mit 0,25% Tween 20 für Western Blot

PBS 10 x	100 ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml
Tween 20	2,5 ml

Net-2 Puffer pH 7,4 (Lagerung bei +4 °C):

NaCl (300 mM)	4,384 g
Tris-HCl (50 mM)	1,97 g
Nonidet P (NP) -40 (0,05%)	125 µl
Steriles bidest. Wasser	Ad 250 ml

4x Sample Puffer für Western Blot, Lagerung bei -20 °C):

H ₂ O	16 ml
0,5 M Tris pH 6.8	4 ml
Glycerol	3,2 ml

SDS 10%	6,4 ml
β-Mercaptoethanol	1,6 ml
0,2% Bromphenolblau	32 ml

Lower Tris Puffer pH 8,8

Tris Base	31,46 g
Tris HCl	3,72 g
SDS 10%	8 ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 200 ml

Upper Tris Puffer pH 6,8

Tris Base	0,182 g
Tris HCl	3,72 g
SDS 10%	2 ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 50 ml

Laufpuffer 10x

Tris Base	30,25 g
Glyzin	144,1 g
SDS	10 g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

Gebrauchslösung 1x

Transferpuffer 10x

Tris Base	24,2 g
Glyzin	112,4 g
SDS	1 g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

Gebrauchslösung:

Methanol 10%	100 ml
Transferpuffer 10x	100 ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

0,1 M Glyzin pH 2,6 für Western Blot (Membranbehandlung zur Entfernung von Primär- und Sekundärantikörper)

Glyzin	1,5 g
Steriles bidest Wasser	Ad 200 ml

Zitratpuffer**Stammlösung A (0,1 M Zitronensäure):**

$C_6H_8O_7 \times H_2O$	21 g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

Stammlösung B (0,1 M Natriumcitrat):

$C_6H_5O_7Na_3 \times 2 H_2O$	28,41 g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

Gebrauchslösung:

Stammlösung A	9 ml
Stammlösung B	41 ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 500 ml

IHC-Puffer (Immunhistochemiepuffer) 10x, pH 7,2 -7,4

Na_2HPO_4	12 g
KH_2PO_4	2 g
KCl	2 g
NaCl	80 g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

IHC-Puffer (Immunhistochemiepuffer) 1x/ 0,3% Triton X-100, pH 7,2 -7,4

IHC-Puffer 10x 100 ml

Steriles bidest. Wasser Ad 1000 ml

3 ml Triton X-100 nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 7,2 – 7,4 zugeben

8.2 Reagenzien

- 0,1 M Glyzin (pH 2,6, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, CH)
- 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH)
- 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH)
- 2 x Rapid Ligation Buffer, T₄ DNA Ligase und T₄ DNA Ligase, 3 U/μl (Promega, Madison, USA)
- 40% Acrylamide/Bis Solution (MBI Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, CH)
- ABC-System, Vectastatin ABC Kit (Vector laboratories, Inc., Burlingame, USA)
- Actin sc1616, polyklonaler Antikörper aus der Ziege (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, DE)
- Agarose, ultraPure, Electrophoresis Drag (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, DE)
- Ampicillin 100 μg/ml (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, CH)
- Anti Mouse IgG (Promega, Madison, USA)
- AntiCytochromeP450 IA2, polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, anti rat and mouse (MiliporeTM, Temecula, USA)
- APS Ammonium Persulfate (BioRad, Reinach, CH)
- biotinylated anti goat IgG, made in horse (Vector laboratories, Inc., Burlingame, USA)
- Bradford Quick Start (BioRad, Reinach, CH)
- C₆H₅O₇Na₃ x 2H₂O (Tri-Natriumcitrat-Dihydrat; Merck, Darmstadt, DE) ·
- C₆H₈O₇ x H₂O (Zitronensäuremonohydrat; Merck KGaA, Darmstadt, DE) ·
- Chemilumineszenz-Kit (Immun Star® Chemiluminescent Kit, BioRad, Basel, CH)
- Chloroform, Rotisolv® (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH)
- Chromogen DAB, Liquid DAB+Substrate (Dako, Baar, CH)
- Collagenase NB8 Broad Range from Clostridium hämolyticum 1G (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE)
- dbcAMP (2'-Dibutyryladenosen 3'-cyclic monophosphate sodium salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE)

- Difco™ LB AGAR, Miller (Luria-Bertani) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA)
- Difco™ LB BROTH, Miller (Luria-Bertani) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA)
- DMEM/Ham's F12 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, A)
- DNA Loading Dye 6% (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE)
- Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems (Promega, Madison, USA).
- Dulbecco's PBS 10x (PAA Laboratories GmbH, Pasching, A)
- E.coli, XL1 Blue competent cells (Stratagene Europe, Amsterdam, NL)
- EDTA (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, DE)
- Eindeckmittel, Pertex® (HistoLab®Products AB, Gothenburg, SE)
- Ethanol (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH)
- Ethidiumbromid 1% (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH)
- FastStart Universal Probe Master Mastermix (Roche, Basel, CH)
- FCS (Fetal Bovine Serum Gold) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, A)
- Formaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche, Basel, CH)
- GAPDH sc47724, monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen Mensch (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, DE)
- GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent Kit (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH)
- Glutamin 200 mM (PAA Laboratories GmbH, Pasching, A)
- Glycergel, Dako glycergel mounting medium (Dako, Baar, CH)
- Glycerol Rotipuran®: 99,5% wasserfrei (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH)
- Glyzin (Sigma-Aldrich, Chemi GmbH, Deisendorf, DE)
- Goat Anti-Rabbit (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Goat IgG (Vector laboratories, Inc., Burlingame, USA)
- Hämaun Mayer sauer KA (Kantonsapotheke Zürich, CH)
- HCl, Salzsäure rauchend, 37% (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- Immunfluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper Alexa Fluor®594 Goat anti rabbit IgG (Invitrogen, Zug, CH)
- IPTG 0,1 M (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, CH)
- Isopropanol/2-Propanol, Rotipuran® (Roth GmbH & Co., Arlesheim, CH)
- ITS Supplement 100x (Insulin, Transferrin, Selenium) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, A)

- K_2HPO_4 (Kaliumphosphat monobasisch; Merck, Darmstadt, DE) ·
- KCl (Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt, DE) ·
- KH_2PO_4 (Kaliumhydrogenphosphat; Merck, Darmstadt, DE)
- Lysisbuffer, Passive Lysis Buffer, 5 x Reagent (Promega, Madison, USA)
- Methanol (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- Mouse Anti-Rabbit IgG (Pierce, Rockford, USA)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Di-Natriumhydrogenphosphat; Merck, Darmstadt, DE)
- NaCl (Natriumchlorid; Merck, Darmstadt, DE)
- NaOH (Natriumhydroxid; Merck, Darmstadt, DE)
- Nonidet P-40 (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, DE)
- Normal Goat Serum (KPL, Gaithersburg, USA)
- Normal Horse Serum (Vector laboratories, Inc., Burlingame, USA)
- Penicillin/Streptomycin 100x (PAA Laboratories GmbH, Pasching, A)
- PGE_2 (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, CH)
- pGEM-T® Vektor System (Promega, GmbH, Mannheim, DE)
- pGL3 Basic Vector, Luciferase Reporter Vectors (Promega, Madison, USA)
- PGT-Antikörper (G-17) sc-103085, affinity purified goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, DE)
- PrecisionPlusProtein™, Dual Color Standards (BioRad, Reinach, CH)
- pRL *Renilla* Luciferase Control Reporter Vector (Promega, Madison, USA)
- Proteinaseinhibitor (10 µl/ml Puffer, Sigma-Aldrich™ Chemie GmbH, Buchs, CH)
- Pure Yield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, USA)
- QIAEXII Gelextraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)
- Restriktionsendonukleasen Nco I und Not I, NE Buffer 3 und Bovines Serumalbumin (New England Biolabs Inc, Frankfurt a.M., DE)
- Restriktionsendonukleasen XhoI und HindIII, NEBuffer2 10% und Bovines Serumalbumin (New England Biolabs Inc, Frankfurt a.M., DE)
- Reverse Transkriptase (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH)
- Riboloc RNase Inhibitor, 40 U/µl (Fermentas, Le-Mont-sur-Lausanne, CH)
- RNeasy® (Ambion Biotechnologie GmbH, Wiesbaden, DE)
- RQ1 DNase RNase-Free (Promega, Madison, USA).
- SDS (Sodiumdodecylsulfat; Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, DE)
- SuperSignal®-West-Femto-Maximum-Sensitivity-Substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA)

- TEMED Tetraethylenmethyldiamin (BioRad, Reinach, CH)
- Tris Base (Trizma® base, Minimum 99,9% Titration, Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, DE)
- Tris-HCl (Trizma® Hydrochlorid, Reagent Grade; Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, DE)
- Triton-X 100 (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, DE)
- Trizol® (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, DE)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, DE)
- Wasserstoffperoxid, 30%, (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- Xgal 50mg/ml (Promega, Madison, USA)
- Xylol (Merck, Darmstadt, DE)
- Zitronensäuremonohydrat (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- β -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, DE)

8.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

- 6-, 12-well-plates (TPP®, Zellkulturplatte 6 oder 12, Trasadingen, CH)
- 7500 Fast Realtime PCR System (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH)
- 96-well optical plate (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH)
- 96-Well-Plate (Flat Bottom Microplates, Chromalux, Dynex Technologies, Chantilly, USA)
- Adhäsionsobjektträger (SuperFrost Plus®, Menzelgläser, Braunschweig, DE)
- Aerosol-Resistant-Tips® gestopfte Pipettenspitzen (Molecular Bio Products Inc., San Diego, USA)
- Coverplates (Shandon Coverplates™ Cheshire, UK)
- Digitalkamera Colorview 12 (Leica Microsystems, Glattbrugg, CH)
- Eindeckanlage Meisei (medite Medizintechnik, Nunningen, CH)
- Einmalmesser für Mikrotom Shandon MB DynaSharp Microtome Blade (Thermo, Histocom AG, Zug, CH)
- Einwegküvetten (Semimicrovolume cuvette, quartz, BioRad, Reinach, CH)
- Elektrophoresekammer (Owl easy cast™ B1A, Thermo Scientific, Reinach, CH)
- Fedegari Autoklav (Fischer Scientific, Wohlen, CH)
- GS-15R Centrifuge (Beckmancoulter, Krefeld, DE)
- Handschuhe sempercure® (Semperit technische Produkte, Wien, A)

- Heizplatte/Magnetrührer Ikamak RTC (Ika Labortechnik, Staufen, CH)
- Inkubationsschrank für Zellkulturen, Forma Steri cycle CO₂ Incubator, Thermo Scientific, Zürich, CH)
- Kühlschrank Elektrolux Save Energy (Elektrolux, Wallisellen, CH)
- Laborwasseraufbereitungsanlage Barnstead EasyPure II (Thermo Scientific, Zürich, CH)
- Laminar-flow-Haube, ScanlafSave 1800 (Vitatek/Vitaris, Baar, CH)
- Lichtmikroskop (Leica, DMLB®, Leica Microsystems, Glattbrugg, CH)
- Lumineszenzspektrometer (MLX Microplate Luminometer, Dynex Technologies, Chantilly, USA)
- Mikroskop für Zellkultur (VWR, Dietikon, CH)
- Mikroskopisches Deckglässchen (E. Gribi AG, Bern, CH)
- Mikrowelle Polaron Division (BioRad, Reinach, CH)
- Mini Protean® Tetracell (BioRad, Reinach, CH)
- Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ (BioRad, Reinach, CH)
- Oligo Express Software (Gene Link™, Hawthorne, USA)
- Petrischale (Sterilin Limited, Newport, UK)
- pH-Meter Orion (Hügli Labortec, Abtwil, CH)
- Pipetierhilfe Pipetus (Hirschmann, Weinsberg, DE)
- Pipettenspitzen, Aerosol Resistant Tips (ART, San Diego, USA)
- Pipettenspitzen, epiT.I.P.S.Standard (Vaudaux-Eppendorf, Basel, CH)
- Power Pac™ (BioRad, Reinach, CH)
- Pumpe für Zellkultur, Modell Fb 70157 (Fisher Scientific AG, Wohlen, CH)
- PVDF-Membran (Immuno-Blot PVDF Membran, BioRad, Reinach, CH)
- Reaktionsgefäss (Safe Seal Gefäss, 1,5 ml, SARSTEDT, Nürnberg, DE)
- Rotationsmikrotom (RM1160®, Leica Microsystems, Nussloch, DE)
- Safe Seal Gefäss, 0,5 ml (Sarstedt, Nürnberg, DE)
- Schüttler KS 15-Control (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE)
- Serological pipettes, 5, 10, 25 ml (VWR, Dietikon, CH)
- Software analySIS Pro® (Version 5.0, Soft Imaging System GmbH)
- Software GraphPad3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA)
- Sonicators (Homogenisator VDI 12, VWR, Dietikon, CH)
- Statistikprogramm ImageJ 1.38 x (Wayne Rasband, USA)
- Tankblotsystems (Criterion Blotter, BioRad, Basel, CH)
- Thermocycler (Mastercycler, Vaudaux-Eppendorf AG, Basel, CH)

- Thermomixer Thermostat plus, (Vauxdaux-Eppendorf, Basel, CH)
- Thermorührer MR Hei-Mix L (Heidolf, Schwabach, DE)
- Tiefgefrierschrank -80 °C (Sanyo Labtec, CH)
- Tiefgefrierschrank, -20 °C (Bauknecht, Lenzburg, CH)
- Tiefgefriertruhe -80, VIP+Plus (Sanyo, München, DE)
- trUView Cuvettes (BioRad, Reinach, CH)
- Ultraturrax (Homogenisator VDI 12) (VWR, Dietikon, CH)
- UV-Spektrophotometer (Smart Spect™ Plus, BioRad, Reinach, CH) ·
- Vortexer Genie 2TM (ABS, Dietikon, CH) ·
- Waage Atilon (Acculab, Sartorius Group, DE) ·
- Wärmebad, Isotemp 210 (Fisher Scientific AG, Wohlen, CH)
- Wärmeschrank (Mettler, Typ INB 400, Schwabach, DE)
- Wasserbad TFB 35 (medite Medizintechnik, Nunningen, CH) ·
- Zellschaber 24 mm (TPP®, Trasadingen, CH)
- Zellsieb (Cell strainer 70 µM, BD Falcon, Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA)
- Zentrifuge Hitachi CT 15 RE Himac (VWR, Leuven, BE)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml (TPP®, Trasadingen, CH)

9 Danksagung

Ich möchte allen danken, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren:

PD Mariusz Kowalewski, PhD, der mir dieses interessante Thema zur Bearbeitung überlassen hat und mir einen Grossteil des Materials für die Versuche zur Verfügung gestellt hat. Vielen Dank für die Anleitung bei der Arbeit im Labor, die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Recherche und das gewissenhafte Korrekturlesen der Arbeit.

PD Dr. med. vet. Iris Reichler für die tatkräftige Unterstützung beim Probensammeln, die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und die produktiven Verbesserungsvorschläge.

Sissi Högger im Histologielabor und **Urs Böhler** im molekularbiologischen Labor, die beiden Laboranten haben mich mit viel Herz und Geduld unterstützt.

Dr. med. vet. Alois Boos in seiner Funktion als geduldiger und angenehmer Institutsleiter.

Den Institutsmitarbeitern **Kathrin Süss** und **Milva Unternährer** und meinen Mitdotorandinnen/den **Nele Sprekeler, Corinne Schröter, Tobias Müller, Alexandra Trachsel, Jessica Von Hof und Aykut Gram** für die gute und herzliche Atmosphäre im Büro. Es war wunderbar mit euch!

Und zum Schluss meinen Eltern und meinem Bruder, meinen Freunden und insbesondere meinem Freund Elio, der wahrscheinlich den Löwenanteil meiner Launen in den letzten Monaten über sich ergehen lassen musste.

Danke an euch alle!